

ニッケルイオン (Ni²⁺) による interleukin 8 (IL-8) 発現誘導機序の解析

著者	浅川 三喜
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18049号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122563

博士論文

ニッケルイオン (Ni^{2+}) による
interleukin 8 (IL-8) 発現誘導機序の解析

平成 29 年度
東北大学大学院薬学研究科
医療薬学専攻
浅川 三喜

本論文中で使用した略語一覧

AP-1	activator protein-1
APS	ammonium persulfate
bHLH	basic helix-loop-helix
BIS	<i>N, N'</i> -methylene-bisacrylamide
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
C/EBP β	CCAAT/enhancer-binding protein β
COX-2	cyclooxygenase-2
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
Hepes	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HIF	hypoxia-inducible factor
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide

2-ME	2-mercaptoethanol
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
PAS	Per-Arnt-Sim
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate-buffered saline
PHD2	proline hydroxylase
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
RPMI	roswell park memorial institute medium
rRNA	ribosomal RNA
ROS	reactive oxygen species
RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecylsulfate
TAD	transactivation domain
TE	tris-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylenediamine
TLR	toll-like receptor
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
TTBS	tween [®] 20 / tris-buffered saline

目次

1. 序論	… 8
2. 実験材料及び試薬の調製	… 12
2-1. 細胞	… 12
2-2. 薬物	… 12
2-3. 試薬	… 12
2-4. プライマー	… 15
2-5. プラスミド	… 15
2-6. 抗体	… 16
2-7. キット	… 16
2-8. 試薬の調製	… 18
2-8-1. 細胞培養関連試薬の調製	… 18
2-8-2. ELISA 関連試薬の調製	… 19
2-8-3. Quantitative real-time PCR 関連試薬の調製	… 19
2-8-4. Western blotting 関連試薬の調製	… 20
2-8-5. 結合タンパク質の解析関連試薬の調製	… 26
2-8-6. 免疫沈降法関連試薬の調製	… 26
2-8-7. 免疫染色法関連試薬の調製	… 26
2-8-8. 大腸菌培養関連試薬の調製	… 27
3. 実験方法	… 29
3-1. ELISA 法	… 29
3-1-1. THP-1 細胞の継代および培養	… 29

3-1-2. 細胞への薬物刺激	… 29
3-1-3. Human IL-8 ELISA	… 30
3-2. Quantitative real-time PCR 法	… 31
3-2-1. 細胞の刺激およびサンプルの回収	… 31
3-2-1-1. THP-1 細胞及び U937 細胞	… 31
3-2-1-2. HEK293 細胞	… 31
3-2-3. Reverse transcription (RT)	… 32
3-2-4. Quantitative real-time PCR	… 33
3-2-5. 解析	… 33
3-3. Western blotting 法	… 34
3-3-1. Western blotting 用 sample の調製	… 34
3-3-2. Western blotting	… 34
3-4. Dual luciferase reporter assay	… 35
3-4-1. Transformation	… 35
3-4-2. 細胞の刺激及びサンプルの回収	… 35
3-4-3. Luciferase 活性の測定	… 36
3-5. Ni-NTA beads、Co-NTA beads へのタンパク質の結合	… 36
3-5-1. 細胞溶解液の調製	… 36
3-5-2. Ni-NTA beads 及び Co-NTA beads へのタンパク質の結合	… 36
3-6. Ni ²⁺ - 及び Co ²⁺ - 結合タンパク質の LC/MS/MS による解析	… 37
3-6-1. 銀染色	… 37
3-6-2. LC/MS/MS	… 38
3-7. 免疫沈降法	… 39

3-7-1. 細胞溶解液の作製	… 39
3-7-2. 免疫沈降法	… 39
3-8. 細胞質タンパク質と核内タンパク質の分離	… 40
3-9. 免疫染色法	… 40
3-9-1. 塗抹標本の作製	… 40
3-9-2. 免疫染色及び観察	… 41
3-10. プラスミドの作製	… 41
3-10-1. pGL4.42 (HRE reporter plasmid) 及び pGL4.75 plasmid (CMV promoter plasmid) の作製	… 41
3-10-2. 野生型及び変異型 HSP90-HA plasmid の作製	… 41
3-10-3. プラスミド精製	… 42
3-11. 変異型 HSP90 β の Ni ²⁺ に対する結合の評価	… 43
3-11-1. Transfection	… 43
3-11. 変異型 HSP90 β の Ni ²⁺ に対する結合の評価	… 43
3-12. 統計処理	… 44
4. 実験結果	… 45
4-1. ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、NiCl ₂ 及び CoCl ₂ が IL-8 発現に及ぼす影響 <時間依存性>	… 45
4-2. ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、NiCl ₂ 及び CoCl ₂ が IL-8 発現に及ぼす影響 <濃度依存性>	… 47
4-3. ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、各種金属が IL-8 発現に及ぼす影響	… 48
4-4. HEK293 細胞及び U937 細胞において NiCl ₂ 及び CoCl ₂ が IL-8 発現に及ぼす影響	… 49

4-5. NiCl ₂ 及び CoCl ₂ による HIF-1 α 発現誘導作用	… 50
4-6. NiCl ₂ 及び CoCl ₂ による IL-8 及び VEGF 発現誘導に対する HIF-1 α 阻害薬 の効果	… 51
4-7. 低酸素による IL-8 及び VEGF 発現誘導作用	… 53
4-8. NiCl ₂ 及び CoCl ₂ による HIF-1 α の転写活性化作用	… 54
4-9. NiCl ₂ による IL-8 発現誘導に対する TLR4 阻害薬の効果	… 55
4-10. NiCl ₂ 及び LPS による IL-8 発現誘導の経時変化の相違	… 56
4-11. Ni ²⁺ に選択的に結合するタンパク質の同定	… 57
4-12. HSP90 β と Ni ²⁺ の結合	… 58
4-13. HSP90 β 、HIF-1 α 、HIF-1 β の相互作用に及ぼす NiCl ₂ 及び CoCl ₂ の影響	… 60
4-14. HIF-1 α 、HIF-1 β の核内移行に及ぼす NiCl ₂ 及び CoCl ₂ の影響	… 61
4-15. HIF-1 α 、HIF-1 β の核内移行に及ぼす NiCl ₂ 及び CoCl ₂ の影響	… 62
4-16. Ni ²⁺ と HSP90 β の結合におけるヒスチジン残基の寄与	… 63
4-17. Ni ²⁺ と結合する HSP90 β の各ドメインの探索	… 64
5. 考察	… 66
6. 参考文献	… 72
謝辞	… 77
発表論文リスト	… 78

1. 序論

ニッケル (Ni) アレルギーはアレルギー性接触性皮膚炎の中で最も患者数の多い疾患であり、その患者数は全人口の 10% 以上であると言われている [1]。Ni は安価であり、合金として用いることで加工性・耐久性を向上させるため、腕時計やピアスなどの装飾品など、身の回りの多くの材料に含まれるだけでなく、ステントや人工関節などの医療用金属材料にも広く用いられている [2]。代表的な Ni 含有金属としては 形状記憶性のあるニチノール、安価で高強度なステンレス鋼、生体親和性に優れる CCM 合金があり、それぞれ 50%、10-12%、1% の割合で Ni を含有している。これらの Ni 含有金属が汗などの体液に触れることによって、 Ni^{2+} が容易に溶出することが明らかとなっており [3]、溶出した Ni^{2+} は炎症反応やアレルギーを誘発することが問題となっている [4]。実際に、Ni アレルギー患者にステントなどの Ni を含有する医療機器を用いることで重篤なアレルギー反応が生じることが報告されている [4]。マウスにおいても研究が行われており、当研究室において、Ni wire を背部皮下に埋入したモデルマウスを用いて、Ni wire から溶出した Ni^{2+} が炎症反応を引き起こすこと、またグラム陰性菌の細胞壁の構成成分である lipopolysaccharide (LPS) などにより炎症を誘発すると Ni wire からの Ni^{2+} 溶出がさらに増強されることを報告してきた [5]。また、Ni wire モデルマウスにおいて、ヒスタミンや cyclooxygenase-2 (COX-2) によるプロスタグランジンの産生誘導などが Ni wire による炎症反応に影響を及ぼすことを明らかにしてきた [6][7]。これらのことから、Ni 含有金属から溶出した Ni^{2+} が炎症を引き起こし、さらに Ni^{2+} の溶出を促進することで、 Ni^{2+} による炎症・アレルギー反応の増悪化が起こると考えられている。現在のところ、Ni アレルギーに対する治療法としてはステロイドや抗ヒスタミン薬を用いた対症療法しか存在せず、根本的な治療薬は開発されていない。その原因として、 Ni^{2+} による炎症誘発作用機構が分子レベルで明らかにされていないことが挙げられる。

Interleukin 8 (IL-8, CXCL8) は Ni アレルギーの病態形成に重要な役割を持つケモカ

インである。IL-8 は主に好中球や T 細胞の浸潤を誘導し、細菌感染時には急性炎症を引き起こし、生体防御に寄与している [8]。一方で、 Ni^{2+} はヒト単球や単球由来樹状細胞において、IL-8 発現を強力に誘導することが明らかとなっている [9][10]。また、Ni アレルギー患者の病変部位には多くの好中球が浸潤すること [11]、ニチノールステントから溶出した Ni^{2+} が IL-8 発現を誘導することで炎症反応を誘発すること [12] が明らかとなっており、 Ni^{2+} 誘導性の炎症反応や Ni アレルギーの病態形成には IL-8 が重要な役割を持つと考えられる。IL-8 の発現制御メカニズムについてはヒトの細胞株を用いた研究が行われており、IL-8 のプロモーター領域には nuclear factor-kappa B (NF- κ B)、hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α)、CCAAT-enhancer-binding proteins beta (C/EBP β)、activator protein 1 (AP-1) などの転写因子の結合配列が存在することが明らかとなっている。腸炎ビブリオは腸管上皮細胞株である Caco-2 細胞に感染することで、extracellular signal-regulated kinase (ERK) や p38 などの MAPK 経路の活性化を誘導し、NF- κ B 及び AP-1 の活性化を介して IL-8 発現を誘導する [13]。グラム陰性菌の細胞壁の構成成分である lipopolysaccharide (LPS) も toll-like receptor 4 (TLR4) を刺激することで NF- κ B の活性化を介して IL-8 発現を誘導する [14]。また、血液凝固因子であるトロンビンも C/EBP β の活性化を介して IL-8 発現を誘導する [15]。塩化コバルトや銀ナノ粒子刺激、低酸素環境などにより発現が誘導された HIF-1 α は IL-8 プロモーター領域に直接結合して IL-8 の転写発現を誘導することが明らかとなっている [16][17]。このように、IL-8 発現は様々な転写因子により制御されており、 Ni^{2+} が IL-8 発現を誘導する機構についてもいくつかの可能性が考えられる。まず、 Ni^{2+} はヒト toll-like receptor 4 (TLR4) のヒスチジン残基に結合することでこれを活性化し、IL-8 を始めとした炎症性遺伝子発現を誘導することが報告されている [18]。また、 Ni^{2+} は proline hydroxylase 2 (PHD2) の活性を抑制して HIF-1 α の発現を上昇させその転写活性化を誘導し、炎症性遺伝子発現を誘導することが明らかとなっている [19]。そのため、 Ni^{2+} は、TLR4 の活性化を介した AP-1 や NF- κ B の活性化のみではなく、HIF-1 α の活性化

を介して IL-8 発現を誘導する可能性がある。HIF-1 α は全身の細胞に恒常的に発現しており、Ni²⁺ による HIF-1 α の活性化は TLR4 非依存的な経路であるため、TLR4 の発現が少ない細胞においても Ni²⁺ は HIF-1 α を活性化することができると考えられる。しかしながら、Ni²⁺ による IL-8 産生において、それぞれの経路が活性化する時間や IL-8 発現に対する寄与については詳細に解析がされておらず、Ni²⁺ による IL-8 発現誘導機構における複数の経路の関与については不明な点が多い。

HIF-1 α は低酸素によりその発現及び活性化が誘導される転写因子であり、血管新生因子や解糖系関連遺伝子発現の誘導に関わっている。通常の酸素濃度においては HIF-1 α は PHD2 により水酸化を受けた後、ユビキチン化を受けてプロテアソームにより分解される。PHD2 の活性化には酸素が必要であるため、低酸素環境になると PHD2 への酸素供給が不足し、HIF-1 α の水酸化が抑制されることで HIF-1 α の分解が抑制され、その発現量が上昇する。発現が上昇した HIF-1 α は核内へ移行することで転写活性化するが、heat shock protein 90 beta (HSP90 β) 及び HIF-1 β は HIF-1 α の活性化に重要な役割を担うことが明らかとなっている [20]。HSP90 β は細胞質に存在し、HIF-1 α と結合することで HIF-1 α の構造を安定化し、その発現量を増加させる。また、HIF-1 β は HIF-1 α とヘテロダイマーを形成することで、HIF-1 α の核内移行及び転写活性化を誘導する [21]。HIF-1 α と HIF-1 β は N 末端側から DNA 結合領域である basic helix-loop-helix (bHLH) domain、タンパク質と相互作用する Per-Arnt-Sim (PAS) domain、転写活性化に必要な transactivation domains (TAD) の 3 つのドメインに分かれており、それぞれの PAS domain 同士が結合することで二量体を形成し、DNA に結合することができる [22]。一方、HSP90 β も HIF-1 α の PAS domain に結合するため、HSP90 β と HIF-1 β はいずれも、競合的に HIF-1 α に結合すること [23] が明らかとなっており、HSP90 β は HIF-1 α と HIF-1 β の結合を抑制することで、HIF-1 α の核内移行を抑制する働きがある。

HSP90 β は HIF-1 α や Raf-1 などの様々なタンパク質の高次構造を変化させることでその機能に影響を与える分子シャペロンであり、細胞の生存や、正常な機能の維持に

必須のタンパク質である [24]。HSP90 β は 4 つのドメインに分かれており、それぞれ N 末端から ATP binding domain、linker domain、middle domain、dimerization domain と呼ばれている [25]。HSP90 β は C 末端の dimerization domain が結合することで二量体化し、二量体化した HSP90 β が N 末端の ATP binding domain を介して ATP と結合してこれを加水分解することで活性化し、middle domain を介してタンパク質と結合し、タンパク質の構造を安定化する [25][26]。HSP90 β は全身の細胞に発現し多様な作用を持ち、TLR4 を介した炎症反応や白血球浸潤などにも関与することが明らかになっている [27][28]。

Ni²⁺ 及び Co²⁺ は類似した生理作用を持つことが知られている。これらは前述のような TLR4 活性化作用 [29]、HIF-1 α 発現量誘導作用を持つのみでなく [19]、DNA 傷害を引き起こす作用 [30] や、活性酸素種 (ROS) 産生を誘導する作用 [31]、zinc finger protein の活性を抑制する作用を持つ [32]。これらの類似した作用を示すにもかかわらず、Ni²⁺ は Co²⁺ よりも IL-8 発現や炎症を誘発する作用が強く [9][33]、Ni²⁺ には Co²⁺ とは明らかに異なった生理作用があり、これが IL-8 発現及び炎症の誘発に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、これまで、Ni²⁺ に特有の生理作用は発見されておらず、Ni²⁺ の炎症誘発作用が Co²⁺ よりも強力である原因についてはいまだ不明である。そこで、本研究では、Ni²⁺ 及び Co²⁺ の違いに着目することで Ni²⁺ に特有の標的タンパク質を見出し、Ni²⁺ による炎症誘発作用機構の解明につなげることを目的とした。

本研究ではヒト単球様細胞株 THP-1 細胞を用い、Ni²⁺ による IL-8 発現誘導機構を指標として解析した。単球は血中の白血球で、ステントなどから溶出した Ni²⁺ に直接応答して IL-8 などを発現すると考えられる。THP-1 細胞は Ni²⁺ に応答して IL-8 を発現することが明らかとなっており [34]、THP-1 細胞において Ni²⁺ による IL-8 発現誘導機構を明らかにすることで、ステントなどにより誘導される炎症反応の分子メカニズムの解明につながると考えられる。

2. 実験材料及び試薬の調製

2-1. 細胞

THP-1 細胞

東北大学加齢医学研究所

医用細胞資源センター・

細胞バンク

HEK293 細胞

独立行政法人理化学研究所

HEK293FT 細胞

独立行政法人理化学研究所

U937 細胞

JCRB 細胞バンク

2-2. 薬物

Cobalt (II) chloride (CoCl_2)

和光純薬工業株式会社

Iron(II) Chloride (FeCl_2)

和光純薬工業株式会社

Lipopolysaccharide (LPS)

和光純薬工業株式会社

Nickel (II) chloride hexahydrate ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

和光純薬工業株式会社

Palladium (II) chloride (PdCl_2)

和光純薬工業株式会社

PX-478 HCl

Medkoo biosciences

TAK-242

Calbiochem

Zinc chloride (ZnCl_2)

和光純薬工業株式会社

2-3. 試薬

Acetic acid

和光純薬工業株式会社

Acrylamide

和光純薬工業株式会社

Agar	Becton, Dickinson and Company
Amersham Hybond™ ECL (ニトロセルロース膜)	GE Healthcare
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)	和光純薬工業株式会社
Ammonium persulfate (APS)	和光純薬工業株式会社
Ampicillin sodium	和光純薬工業株式会社
Block Ace	DS ファーマバイオメディカル株式会社
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromophenol blue	和光純薬工業株式会社
DAPI	同仁化学研究所
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	和光純薬工業株式会社
Disodium hydrogen phosphate 12-water ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	和光純薬工業株式会社
Ethanol	和光純薬工業株式会社
Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate ($\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	同仁化学研究所
Fetal bovine serum (FBS)	Equitech-Bio, Inc.
Glycerol	和光純薬工業株式会社
Glycine	和光純薬工業株式会社
L (+)-Glutamine	和光純薬工業株式会社
Hydrochloric acid (HCl)	和光純薬工業株式会社
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (Hepes)	同仁化学研究所
Imidazole	和光純薬工業株式会社

L-Lactate dehydrogenase	Roche
Leupeptin	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol (2-ME)	和光純薬工業株式会社
Methanol	和光純薬工業株式会社
<i>N, N'</i> -Methylene-bisacrylamide (BIS)	和光純薬工業株式会社
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate (<i>p</i> NPP)	Sigma-Aldrich
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific
Penicillin G potassium	明治製菓株式会社
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	和光純薬工業株式会社
Phosphoric acid (H ₃ PO ₄)	和光純薬工業株式会社
Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween® 20)	和光純薬工業株式会社
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Potassium chloride (KCl)	和光純薬工業株式会社
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	和光純薬工業株式会社
2-Propanol	和光純薬工業株式会社
Pyruvate kinase	オリエンタル酵母工業株式会社
Recombinant Human HSP90 beta Protein	StressMarq Biosciences Inc.
RNAiso Plus	タカラバイオ株式会社
Sodium chloride (NaCl)	和光純薬工業株式会社
Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate (NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O)	和光純薬工業株式会社
Sodium dodecylsulfate (SDS)	和光純薬工業株式会社
Sodium fluoride (NaF)	和光純薬工業株式会社
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	和光純薬工業株式会社
Sodium hydroxide (NaOH)	和光純薬工業株式会社

Sodium orthovanadate (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich
Streptomycin sulfate	明治製菓株式会社
<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylenediamine (TEMED)	和光純薬工業株式会社
Triton X-100	和光純薬工業株式会社
Tryptone	Becton, Dickinson and Company
Yeast extract	Becton, Dickinson and Company

2-4. プライマー

• 18 S rRNA

forward: 5'-TTGACGGAAGGGCACCACCAG-3'

reverse: 5'-GCACCACCACCCACGGAATCG-3'

• IL-8

forward: 5'- CAATCCTAGTTTGATACTCCC -3'

reverse: 5'- AATTACTAATATTGACTGTGGAG -3'

• VEGF

forward: 5'- AGGCCAGCACATAGGAGAGA -3'

reverse: 5'- TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT -3'

株式会社グライナージャパン

2-5. プラスミド

Hsp90 HA plasmid

William Sessa より供与

(Addgene plasmid # 22487) [35]

pGL4.42

Promega

pGL4.75

Promega

2-6. 抗体

・ 1 次抗体

Goat anti-actin polyclonal antibody [1:1000]	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti HIF-1 α antibody [1:200]	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti HIF-1 β antibody [1:200]	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti Lamin B antibody [1:200]	Santa Cruz Biotechnology
Mouse Anti-Hsp90 antibody [1:1000]	BD biosciences
Mouse anti α tubulin antibody [1:200]	Santa Cruz Biotechnology
Mouse Monoclonal Anti-HIF-1 alpha Antibody [1:200]	Novus Biologicals
Rabbit HA-Tag Polyclonal Antibody [1:1000]	Clontech

・ 2 次抗体

Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor [®] 568)	Abcam
Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-goat IgG antibody [1:1000]	BioMakor
HRP conjugated anti-mouse IgG antibody [1:2000]	BioMakor
HRP conjugated anti-rabbit IgG antibody [1:10000]	BioMakor

各抗体液は [] 内の希釈倍率に従って、1% (w/v) BSA-TTBS 溶液中に希釈して使用した。

2-7. キット

Competent Quick DH5 α	東洋紡績株式会社
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega
FastGene Gel/PCR Extraction Kit	日本ジェネティクス株式会社

FastGene Plasmid Mini Kit	日本ジェネティクス株式会社
FuGENE HD transfection reagent	Promega
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience
In-Gel Tryptic Digestion Kit	Thermo Fisher Scientific
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	東洋紡績株式会社
Polyethylenimine "Max"	Polysciences, Inc.
Pierce Silver Stain for Mass Spectrometry	Thermo Fisher Scientific
PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)	タカラバイオ株式会社
Plasmid DNA Extraction Midi Kit	Favorgen
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
SureBeads Protein A/G Magnetic Beads	Bio-Rad
Smear Gell®	日本ジェネティクス株式会社
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> ™ II (Tli RNaseH Plus)	タカラバイオ株式会社
Western blotting Detection Reagent	GE Healthcare
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics

2-8. 試薬の調製

2-8-1. 細胞培養関連試薬の調製

・ Phosphate-buffered saline (PBS) (10 ×)

NaCl	40	g
KCl	1	g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	14.5	g
KH ₂ PO ₄	1	g
<hr/>		
Ultrapure water	500	ml

121℃ で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。ultrapure water で 10 倍希釈後に使用した。

・ PBS-0.02% EDTA

1 x PBS	500	ml
0.5 M EDTA · 2Na	674	μl

121℃ で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

• **RPMI1640**

RPMI1640	5.1	g
Ultrapure water	500	ml

調製後、121℃ で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。その後、以下の試薬を RPMI1640 の一部に溶解し、pore size 0.22 μm の membrane filter (Millipore) で濾過滅菌して加えた。

L (+)-Glutamine	146	mg
NaHCO ₃	1000	mg
penicillin G potassium	9	mg
streptomycin sulfate	25	mg

• **DMEM**

DMEM	4.75	g
Ultrapure water	500	ml

調製後、121℃ で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。その後、以下の試薬を DMEM の一部に溶解し、pore size 0.22 μm の membrane filter (Millipore) で濾過滅菌して加えた。

L (+)-Glutamine	292	mg
NaHCO ₃	750	mg
penicillin G potassium	9	mg
streptomycin sulfate	25	mg

• **FBS、CS**

56℃ で 30 分間非働化処理を行った後、4℃、1,000 × g で 20 分間遠心し、その上清を用いた。

2-8-2. ELISA 関連試薬の調製

・ 25 × Wash buffer

NaCl	100	g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	36.25	g
KH ₂ PO ₄	2.5	g
KCl	2.5	g
Tween® 20	6.25	ml
<hr/>		
i.e. water	500	ml

i.e. water で 25 倍希釈後に使用した。

・ 1 M H₃PO₄

H ₃ PO ₄	30	ml
Ultrapure water	470	ml

2-8-3. Quantitative real-time PCR 関連試薬の調製

・ DEPC 処理水

DEPC	1	ml
Ultrapure water	1	L

添加後よく混合し、室温で一晩放置した後、121℃ で 40 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

・ 75% Ethanol

Ethanol	30	ml
DEPC 処理水	10	ml

• **1 M Tris (pH 8.0)**

Tris	6.06	g
i.e. water	50	ml

5 M HCl 水溶液を用いて pH 8.0 に調整した。

• **0.5 M EDTA (pH 8.0)**

EDTA · 2Na · 2H ₂ O	9.31	g
i.e. water	50	ml

5 M NaOH 水溶液を用いて pH 8.0 に調整した。

• **100 mM Tris, 10 mM EDTA (10 × TE, pH 8.0)**

1 M Tris (pH 8.0)	10	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2	ml
i.e. water	88	ml

調製後、121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

• **1 × TE (pH 8.0)**

10 × TE	10	ml
i.e. water	90	ml

• **Quantitative real-time PCR 反応溶液**

SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> TM II (Tli RNaseH Plus)	5	μl
PCR forward primer (25 μM)	0.1	μl
PCR reverse primer (25 μM)	0.1	μl
Ultrapure water	3.8	μl

プライマーは 1 × TE で溶解したものを使用した。

2-8-4. Western blotting 関連試薬の調製

• **30% (w/v) Acrylamide 溶液**

Acrylamide	29.2	g
BIS	0.8	g
<hr/>		
Ultrapure water	100	ml

• **APS (200 mg/ml)**

APS	0.2	g
Ultrapure water	1	ml

• **Lysis buffer (stock)**

Hepes	2.38	g
Triton X-100	5	ml
Glycerol	50	ml
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	186	mg
<hr/>		
Ultrapure water	500	ml

• **Lysis buffer (working)**

Lysis buffer	1	ml
PMSF (1.0 mg/ml in isopropanol)	10	μl
Leupeptin (10 mg/ml in ultrapure water)	1	μl
NaF (1.0 M in ultrapure water)	50	μl
<i>p</i> NPP (250 mM in ultrapure water)	10	μl
Na ₃ VO ₄ (100 mM in ultrapure water)	10	μl

• **10 × Ponceau S 溶液**

Ponceau S	20	g
Acetic acid	100	ml
<hr/>		
Ultrapure water	500	ml

i.e. water で 10 倍希釈後に使用した。

• **10 × Running buffer**

Tris	30	g
Glycine	142.5	g
SDS	10	g
<hr/>		
Ultrapure water	1	L

i.e. water で 10 倍希釈後に使用した。

• **5 × Sample buffer**

濃縮ゲル用 buffer	7.8	ml
SDS	3	g
Glycerol	10	ml
2-ME	5	ml
Bromophenol blue	1.5	mg

• **10 × TTBS (Tween[®] 20 / Tris-buffered saline)**

Tris	96.92	g
NaCl	350.64	g
<hr/>		
Ultrapure water	2	L

5 M HCl を用いて pH 7.5 に調整した後、Tween[®] 20 を 20 ml 加えた。Ultrapure water で 10 倍希釈後に使用した。

• **5 × Transfer buffer**

Tris	15.14	g
Glycine	72.07	g
<hr/>		
Ultrapure water	1	L

5 M HCl 水溶液を用いて pH 8.3 に調整した。

• **1 × Transfer buffer**

5 × Transfer buffer	500	ml
Methanol	500	ml
Ultrapure water	1.5	L

• 分離ゲル用 buffer

Tris	18.2	g
SDS	0.4	g
<hr/>		
Ultrapure water	100	ml

5 M HCl 水溶液を用いて pH 8.3 に調整した。

• 濃縮ゲル用 buffer

Tris	6.1	g
SDS	0.4	g
<hr/>		
Ultrapure water	100	ml

5 M HCl 水溶液を用いて pH 6.8 に調整した。

• 8% 分離ゲル

30% (w/v) Acrylamide 溶液	6.4	ml
分離ゲル用 buffer	6	ml
i.e. water	11.6	ml
APS (200 mg/ml)	70	μl
TEMED	30	μl

• 4% 濃縮ゲル

30% (w/v) Acrylamide 溶液	0.8	ml
濃縮ゲル用 buffer	1.5	ml
i.e. water	3.7	ml
APS (200 mg/ml)	50	μl
TEMED	7.5	μl

2-8-5. 結合タンパク質の解析関連試薬の調製

• NTA-beads 用 lysis buffer

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	7.8	g
NaCl	17.54	g
Tween 20	22.5	μl
<hr/>		
Ultrapure water	1	L

5M NaOH を用いて pH 8.0 に調製した。

• Elution buffer

Imidazole	6.808	g
NTA-beads 用 lysis buffer	100	ml

2-8-6. 免疫沈降法関連試薬の調製

• PBS-T

Tween 20	100	μl
1 x PBS	100	ml

2-8-7. 免疫染色法関連試薬の調製

• 1% BSA-PBS

BSA	1	g
1 x PBS	100	ml

2-8-8. 大腸菌培養関連試薬の調製

• 100 mg/ml Ampicillin

Ampicillin sodium	100	mg
Ultrapure water	1	ml

調製後、pore size 0.2 μm の membrane filter (東洋濾紙株式会社) で濾過滅菌した。

• LB-ampicillin-medium

NaCl	2.5	g
Tryptone	5	g
Yeast extract	2.5	g

調製後、121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。使用直前に、上記 1 ml 当たり 1 μl の 100 mg/ml ampicillin を加えた。

• **LB-ampicillin-agar**

NaCl	0.5	g
Tryptone	1	g
Yeast extract	0.5	g
Agar	1.5	g
<hr/>		
Ultrapure water	100	ml

調製後、121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。45-55°C 程度まで冷えたら 100 μ l の 100 mg/ml ampicillin を加えて混和し、100 mm dish (Greiner bio-one) に 15 ml ずつ入れて固めた。

• **60% Glycerol**

Glycerol	60	ml
Ultrapure water	40	ml

調製後、121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

3. 実験方法

3-1. ELISA 法

3-1-1. THP-1 細胞の継代および培養

THP-1 細胞が 100 mm petri dish (Greiner Bio-One) 中で約 80% コンフルエント状態になった段階で細胞懸濁液を 50 ml 遠沈管に回収した。500 × g で 3 分間遠心後、上清を除き、10% FBS-RPMI1640 で懸濁し、100 mm petri dish に適量を添加し、10% FBS-RPMI1640 10 ml 中で 5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。残りの細胞懸濁液中の細胞数を血球計算盤を用いてカウントした後に実験に用いた。

3-1-2. 細胞への薬物刺激

10% FBS- RPMI1640 中に 5×10^5 cells/ml の濃度になるように調製した THP-1 細胞を、96 well plate (Becton, Dickinson and Company) に 100 µl/well 播種し、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養後、それぞれ LPS (1 mg/ml in ultrapure water), NiCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, PdCl₂ (1 M in ultrapure water), PX-478 (25, 50 mM in saline) 及び TAK-242 (1 mM in DMSO) を 10% FBS-RPMI1640 で 100 倍希釈した溶液を 10 µl/well 添加した。5% CO₂ 存在下 37°C で一定時間培養後、培養液をマイクロチューブに回収し、500 × g で 3 分間遠心後、上清を回収した。回収した培養液は -20°C で保存し、ELISA 法により IL-8 濃度を測定した。

3-1-3. Human IL-8 ELISA

IL-8 の測定は Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go![®] を用いて付属のプロトコルに準じて行った。測定を行う前日に coating buffer を用いて 250 倍希釈した capture antibody を 96 well plate (住友ベークライト株式会社) に 100 μ l/well 添加し、4°C で一晩静置した。翌日、250 μ l/well の 1×wash buffer で 5 回洗浄後、1×assay diluent を 200 μ l/well 加えて室温で 1 時間静置し、blocking を行った。1 時間後に同様の洗浄を 5 回行い、3-1-2. に記した方法で得られた sample を必要に応じて 1×assay diluent で希釈し、100 μ l/well 加えて室温で 2 時間静置した。2 時間後、同様の洗浄を 5 回行い、1×assay diluent を用いて 250 倍希釈した detection antibody を 100 μ l/well 加えて室温で 1 時間静置した。1 時間後、同様の洗浄を 5 回行い、1×assay diluent で 250 倍希釈した avidin-HRP を 100 μ l/well 加えて遮光下室温で 30 分静置した。30 分後、同様の洗浄を 7 回行い、1×TMB substrate solution を 100 μ l/well 加えて遮光下室温で 15 分静置した。15 分後、1 M H₃PO₄ を 50 μ l/well 加えて軽くタッピングし、iMark[™] Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad) を用いて主波長 450 nm、副波長 570 nm の吸光度を測定し、その差を算出した。グラフの横軸に IL-8 濃度、縦軸に吸光度をプロットし、線形近似による標準式から sample 中 IL-8 濃度を算出した。

3-2. Quantitative real-time PCR 法

3-2-1. 細胞の刺激およびサンプルの回収

3-2-1-1. THP-1 細胞及び U937 細胞

10% FBS-RPMI1640 中に 5×10^5 cells/ml の濃度になるように調製した THP-1 細胞及び U937 細胞を 24 well plate に 500 μ l/well 播種し、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養後、それぞれ LPS (1 mg/ml in ultrapure water), NiCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, PdCl₂ (1 M in ultrapure water), PX-478 (25, 50 mM in saline) 及び TAK-242 (1 mM in DMSO) を 10% FBS-RPMI1640 で 10 倍希釈したものを 5 μ l/well 添加した。5% CO₂ 存在下 37°C で一定時間培養後、培養液をマイクロチューブに回収し、500 \times g で 3 分間遠心後、上清を除き、PBS 250 μ l/tube を添加した。500 \times g で 3 分間遠心後、上清を除き、RNAiso Plus を 200 μ l/well 添加して軽くタッピングした。室温で 5 分静置して total RNA 抽出用サンプルとした。

3-2-1-2. HEK293 細胞

10% FBS-RPMI1640 中に 2.5×10^5 cells/ml の濃度になるように調製した HEK293 細胞を 24 well plate に 500 μ l/well 播種し、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養後、それぞれ NiCl₂ 及び CoCl₂ (1 M in ultrapure water) を 10% FBS- RPMI1640 で 10 倍希釈したものを 5 μ l/well 添加した。5% CO₂ 存在下 37°C で一定時間培養後、上清を除き、PBS 250 μ l/well で 2 回洗浄し、RNAiso Plus を 200 μ l/well 添加して室温で 5 分静置した。細胞溶解液をマイクロチューブに回収し、total RNA 抽出用サンプルとした。

3-2-2. Total RNA 抽出

200 μ l の total RNA 抽出用サンプルに CHCl_3 40 μ l/tube を加え、チューブの蓋をして乳白色になるまでよく振り混ぜた。その後、4°C、12,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離を行い、上層の水相を新しいマイクロチューブに移した。回収した水相に、2-propanol 100 μ l/tube を加えてよく混合し、室温で 10 分間静置した後、4°C、12,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離を行った。その後、上清を取り除き、75% ethanol 250 μ l/tube を加え、4°C、7,500 $\times g$ で 5 分間遠心分離を行った。遠心後、上清を取り除き、再び 75% ethanol 250 μ l/tube を加え、4°C、7,500 $\times g$ で 5 分間遠心分離を行った。遠心後、上清を取り除き、数分間乾燥させた後、20 μ l/tube の DEPC 処理水で溶解した。このように調製した total RNA sample は -80°C で保存した。

3-2-3. Reverse transcription (RT)

本操作は PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) を用いて付属のプロトコルに準じて行った。3-2-2. に記した方法で得られた total RNA sample の濃度を NanoDrop® spectrophotometer ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。200 ng/well に相当する total RNA sample を 96 well PCR plate (WATSON) にとり、DEPC 処理水を加えて全量を 4 μ l/well にした後、5 \times PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) を 1 μ l/well 加えて全量を 5 μ l/well とした。スピンドウン後、PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (タカラバイオ株式会社) を用いて RT 反応を行った。RT 反応終了後、DEPC 処理水を 15 μ l/well 添加して cDNA 濃度を 10 ng/ μ l に希釈した後、-20°C で保存した。

RT 反応条件は以下の通りである。

37°C	85°C	4°C
15 min	5 sec	∞

3-2-4. Quantitative real-time PCR

本操作は SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) を用いて付属のプロトコルに準じて行った。はじめに PCR 反応溶液を調製し、8 連 PCR チューブ (日本ジェネティクス) に 9 µl/well 添加した。そこに 3-2-3. で得られた cDNA (10 ng/µl) を 1 µl/well 加え、スピンドウン後、Thermal Cycle Dice™ Real Time System (タカラバイオ株式会社) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応条件は以下の通りである。

Hold	2 Step PCR		Dissociation		
95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
30 sec	5 sec	60 sec	15 sec	30 sec	15 sec
<hr/>					
40 cycle					

3-2-5. 解析

各 sample の threshold cycle (Ct) 値は 2nd derivative maximum 法により算出し、相対検量線を作成して各遺伝子の PCR 増幅効率が 100% に近いことを確認した後、 $\Delta\Delta Ct$ 法により RNA 相対量に換算した。

3-3. Western blotting 法

3-3-1. Western blotting 用 sample の調製

10% FBS-RPMI1640 中に 5×10^5 cells/ml の濃度になるように調製した THP-1 細胞を、12 well plate に 1 ml/well 播種し、24 時間培養後、それぞれ NiCl_2 及び CoCl_2 (1 M in ultrapure water)、PX-478 (25, 50 mM in saline) を 10% FBS-RPMI1640 で 10 倍希釈した溶液を 10 μl /well 添加した。一定時間後に培養液を 50 ml 遠沈管に回収し、 $500 \times g$ 、 4°C 、3 分間遠心後、上清を除き氷冷 PBS 500 μl /tube を添加した。 $500 \times g$ 、 4°C 、3 分間遠心後、上清を除き、lysis buffer (sample buffer 及び protease inhibitor を含む) を 90 μl /tube 加えタッピングした。氷上で 10 秒間 $\times 2$ 回 sonication を行い、 95°C で 5 分間熱処理し、Western blotting 用 sample とした。Sample は -20°C で保存した。

3-3-2. Western blotting

3-3-1. に記した方法で得られた sample を 20 μl ずつ 8% (w/v) polyacrylamide gel にアプライし、125 V 定電圧で一定時間泳動を行った。泳動終了後、gel を transfer buffer に浸して洗浄し、Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) を用いて 150 mA 定電流で 1 時間ニトロセルロース膜に blotting した。Blotting 後、ニトロセルロース膜を Block Ace に室温で 1 時間浸して blocking を行った後、TTBS で洗浄した。次いで、一次抗体に浸して 4°C で一晩反応させた。反応終了後、TTBS で洗浄し、二次抗体に浸して 4°C で 4 時間反応させた。反応終了後、TTBS で洗浄し、Western blotting Detection Reagent を用いて化学発光させた。その検出には、AE-6955 型ライトキャプチャー (ATTO) を使用した。

3-4. Dual luciferase reporter gene assay

3-4-1. Transfection

本操作は X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent を用いて付属のプロトコルに準じて行った。はじめに 10% FBS-RPMI1640 中に 1.6×10^5 cells/ml の濃度になるように調製した THP-1 細胞を、6 cm dish に 6 ml/dish 播種した。その後、マイクロチューブ中でまず 15-25°C の Opti-MEM 900 μ l に対し、1000 ng/ μ l の pGL4.42 溶液 6.4 μ l と 320 ng/ μ l の pGL4.75 溶液 3.2 μ l を加えた。次に、18 μ l の X-tremeGENE HP DNA transfection Reagent をチューブの壁に付かないように溶液中に混合し、軽く転倒混和した後、室温で 15 分間静置し transfection complex を形成させた。6 cm dish に播種した細胞に全量の transfection complex を滴下し、軽く dish を揺らした後、5% CO₂ 存在下 37°C で 48 時間培養した。

3-4-2. 細胞の刺激及びサンプルの回収

3-4-1. に記した方法で transfection した培養液を 50 ml 遠沈管に回収し、500 × g、3 分間遠心後、上清を除き、6.5 ml の 10% FBS-RPMI1640 に懸濁した。懸濁した THP-1 細胞を、24 well plate に 500 μ l/well 播種し、それぞれ NiCl₂ 及び CoCl₂ (1 M in ultrapure water) を 10% FBS-RPMI1640 で 10 倍希釈した溶液を 5 μ l/well 添加した。5% CO₂ 存在下 37°C で 12 時間培養後、培養液をマイクロチューブに回収し、500 × g、4°C、3 分間遠心後、上清を除き、PBS 500 μ l/tube で懸濁した。500 × g、4°C、3 分間遠心後、上清を除き、1 × Passive Lysis Buffer を 50 μ l/tube 添加してタッピングにより細胞を溶解

した。この細胞溶解液を luciferase 活性の測定に用いた。

3-4-3. Luciferase 活性の測定

本操作は Dual-Luciferase® Reporter Assay System を用いて付属のプロトコルに準じて行った。測定用チューブに Luciferase assay reagent II を 50 µl/tube 加え、3-4-2. に記した方法で得られた細胞溶解サンプルを 10 µl/tube 加えてピペッティング後、直ぐに AB-2200-R Luminescencer PSN (アトー株式会社) で 10 秒間の *Firefly luciferase* 発光積分値を測定した。その後 Stop & Glo reagent を 50 µl/well 加えて軽く混合した後、10 秒間の *Renilla luciferase* 発光積分値を測定した。

3-5. Ni-NTA beads、Co-NTA beads へのタンパク質の結合

3-5-1. 細胞溶解液の調製

10% FBS-RPMI1640 中に 5×10^5 cells/ml の濃度になるように調製した THP-1 細胞を 1 ml/tube でマイクロチューブに回収し、 $500 \times g$ 、4°C、3 分間遠心後、上清を除いた。氷冷 PBS 500 µl/tube を添加し、再度 $500 \times g$ 、4°C、3 分間遠心後、上清を除き、NTA beads 用 lysis buffer を 250 µl/tube 加えタッピングした。氷上で 10 秒間 $\times 2$ 回 sonication を行い、NTA beads 用 lysate とした。

3-5-2. Ni-NTA beads 及び Co-NTA beads へのタンパク質の結合

それぞれ 50% (v/v) の懸濁液である NTA beads、Ni-NTA beads 及び Co-NTA beads を

20 µl/tube 分注し、100 µl/tube の NTA beads 用 lysis buffer を加えタッピングした。Flash により beads を沈殿させ、上清を除き、3-5-1. で回収した細胞溶解液を 100 µl/tube 添加した。4°C で 1 時間転倒混和した後、flash して上清を除き、氷冷した NTA beads 用 lysis buffer 100 µl/tube で 3 回洗浄した。Flash して上清を除き、elution buffer (250 mM imidazole 含有 NTA beads 用 lysis buffer) を 100 µl/tube 添加した。氷上で 2 分間静置し、flash した後の上清を Ni²⁺ 及び Co²⁺ 結合タンパク質として回収し、-80°C 保存した。NTA beads 用 lysate、Ni²⁺ 及び Co²⁺ 結合タンパク質 40 µl/tube と 5×sample buffer 10 µl/tube を混合して 95°C で 5 分間熱処理し、Western blotting 用 sample とした。

3-6. Ni²⁺- 及び Co²⁺- 結合タンパク質の LC/MS/MS による解析

3-6-1. 銀染色

3-5-2. に記した方法で得られた sample を 10 µl ずつ 8% (w/v) polyacrylamide gel にアプライし、125 V 定電圧で一定時間泳動を行った。泳動終了後、gel を Pierce Silver Stain for Mass Spectrometry の付属のプロトコルに準じて銀染色を行った。Gel を ultrapure water に浸し、5 分間 × 2 回振盪した。その後、固定液で 15 分間 × 2 回振盪し、洗浄液で 5 分間 × 2 回振盪した。Ultrapure water で 5 分間 × 2 回振盪し、直前に調製した sensitizer working solution で 1 分間振盪した。再び ultrapure water で 1 分間 × 2 回振盪し、直前に調製した enhancer solution で 5 分間振盪した。その後、ultrapure water で 20 秒間 × 2 回振盪した。Developer working solution 中で振盪し、約 2 分経過後、適切な濃さのバンドが現れた時点で素早く developer working solution を捨て、停止液を加えて室温で 10 分間振盪した。さらに acetic acid 中で 10 分間振盪後、ultrapure water で 10 分間 × 2 回振盪した。

3-6-2. LC/MS/MS

3-6-1. で銀染色を行った gel の一部をスパーテルで切り出し、In-Gel Tryptic Digestion Kit の付属のプロトコルに準じてトリプシン消化を行い、LC/MS/MS 用の sample を調製した。切り出した gel を 1.5 mL マイクロチューブに回収し、200 μ l/tube の destaining buffer 中で 15 分間 \times 2 回 incubation した。その後、200 μ l/tube の wash solution 中で 15 分間 \times 2 回 incubation し、acetonitrile 200 μ l/tube 中で 5 分間 incubation した。その後、acetonitrile を除いて室温で gel を乾燥後、-80°C で保存した。氷上で gel を溶解し、40 μ l/tube の reducing buffer を添加して 60°C で 10 分間 incubation 後、40 μ l/tube の alkylation buffer を添加して室温で 1 時間 incubation した。Alkylation buffer を除き、100 μ l/tube の destaining buffer を添加して 37°C で 15 分間 incubation 後、50 μ l/tube の acetonitrile を添加して室温で 15 分間 incubation した。Vortex により gel を混和し、acetonitrile を除いて室温で 30 分間放置して gel を乾燥させた。乾燥後、trypsin を含む digestion buffer を 25 μ l/tube 添加し、37°C で一晩 incubation した。遠心により gel を沈殿させ、上清を LC/MS/MS 用の sample として回収した。さらにタンパク質を回収するため、50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid in ultrapure water を 20 μ l/tube 添加し、室温で 15 分間 incubation 後、遠心により gel を沈殿させ、上清を先ほどの LC/MS/MS 用の sample に追加した。Speed Vac (Thermo Fisher Scientific) で室温、3 時間遠心することで、sample の溶媒を揮発させ、乾燥したタンパク質を 20 μ l/tube の 0.1% trifluoroacetic acid/10% acetonitrile in ultrapure water で溶解した。溶解した sample をフィルター (Millex-GV, 0.22 μ m, PVDF, 33 mm) によりろ過し、得られた sample を nano-HPLC system (UltiMate 1000 RSLCnano, Thermo Fisher Scientific) を用いた逆相カラムクロマトグラフィーにより分離した。移動相には 0.1% formic acid in ultrapure water 及び 0.1% formic acid in acetonitrile を用い、sample のローディングには 0.1% trifluoroacetic acid/2% acetonitrile in ultrapure water を用いた。分離して得られたペプチドの配列を

Orbitrap Velos Pro mass spectrometer により解析し、得られたペプチド配列の情報から Swiss-Prot のデータベースを基にタンパク質を同定した。

3-7. 免疫沈降法

3-7-1. 細胞溶解液の作製

10% FBS-RPMI1640 中に 1×10^6 cells/ml の濃度になるように調製した THP-1 細胞を、6 cm dish に 6 ml/dish 播種し、24 時間培養後、それぞれ NiCl_2 及び CoCl_2 (1 M in ultrapure water) を 6 $\mu\text{l}/\text{well}$ 添加した。刺激 8 時間後に培養液を 15 ml 遠沈管に回収し、 $500 \times g$ 、 4°C 、3 分間遠心後、上清を除いて lysis buffer (protease inhibitor を含む) を 250 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 加えタッピングした。氷上で 10 秒間 $\times 2$ 回 sonication を行い、細胞を破碎した。 $14,000 \times g$ 、 4°C 、10 分間遠心後、上清を免疫沈降用 sample として回収した。

3-7-2. 免疫沈降法

Bio-Rad の SureBeads Protein A/G Magnetic Beads の付属のプロトコルに準じて行った。Surebeads Protein G Magnetic Beads を 165 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で分注し、PBS-T (0.1% tween20-PBS) 1000 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で 3 回洗浄した。PBS 1320 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で beads を懸濁し、Mouse Monoclonal Anti-HIF-1 alpha antibody (Novus Biologicals, 1 mg/ml) を 1 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、または Goat anti HIF-1 β antibody (Santa Cruz, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 33 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 添加し、室温で 10 分間転倒混和した。上清を除き、PBS-T 1000 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で 2 回洗浄した。PBS-T 1000 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で beads を懸濁し、330 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で 3 本に分注し、上清を除いた。各 beads に 3-7-1. で得られた免疫沈降用 sample 100 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 添加し、 4°C 、1 時間転倒混和した。PBS-T 1000 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で 3 回洗浄し、sample buffer 及び protease inhibitor を含む lysis buffer 20 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で懸濁し、 95°C 、5 分間熱処理を行った。上清を IP sample として Western blotting により解析した。

3-8. 細胞質タンパク質と核内タンパク質の分離

Nuclear Extract Kit (Active Motif) の付属のプロトコルに準じて行った。10% FBS-RPMI1640 中に 1×10^6 cells/ml の濃度になるように調製した THP-1 細胞を、6 cm dish に 6 ml/dish 播種し、24 時間培養後、それぞれ NiCl_2 及び CoCl_2 (1 M in ultrapure water) を 6 μl /well 添加した。刺激 8 時間後に培養液を 15 ml 遠沈管に回収し、 $500 \times g$ 、 4°C 、3 分間遠心後、上清を除き、氷冷 PBS/phosphatase inhibitor 1 ml/tube で 2 回洗浄した。細胞を hypotonic buffer 200 μl /tube で懸濁し、氷上で 15 分間静置後、10 秒間 vortex により混和し、 $14,000 \times g$ 、 4°C 、30 秒間遠心した。上清を cytoplasmic (細胞質) sample として回収し、残ったペレットに complete lysis buffer 20 μl /tube 添加し、10 秒間 vortex により混和した。その後、氷上で 180 rpm で 30 分間振盪し、30 秒間 vortex により混和した後、 $14,000 \times g$ 、 4°C 、10 分間遠心した。上清を nuclear (核) sample として回収した。各 sample を Western blotting により解析した。

3-9. 免疫染色法

3-9-1. 塗抹標本の作製

10% FBS-RPMI1640 中に 5×10^5 cells/ml の濃度になるように調製した THP-1 細胞を、96 well plate に 100 μl /well 播種し、24 時間培養後、それぞれ NiCl_2 及び CoCl_2 (1 M in ultrapure water) を 10% FBS-RPMI1640 で 100 倍希釈したものを 10 μl /well 添加した。刺激 8 時間後に培養液をマイクロチューブに回収し、 $500 \times g$ 、 4°C 、3 分間遠心後、上清を除き、PBS 100 μl /tube で細胞を懸濁した。細胞懸濁液 20 μl /plate を用い、

Smear Gel の付属のプロトコルに準じて APS コートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社) 上に塗抹標本を作製した。

3-9-2. 免疫染色及び観察

3-9-1. で作製した塗抹標本を -20°C に冷却した methanol に浸し、 -20°C で 10 分間 incubation した。PBS で 3 回洗浄し、1% BSA-PBS に室温で 1 時間浸して blocking を行った後、1% BSA-PBA で 200 倍希釈した Mouse Monoclonal Anti-HIF-1 alpha Antibody (Novus Biologicals) に浸して 4°C で一晩反応させた。反応終了後、PBS で洗浄し、1% BSA-PBA で 200 倍希釈した Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 568, Abcam) 及び DAPI ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) に浸して室温で 1 時間反応させた。反応終了後、PBS で洗浄し、Fluoromount™ (Diagnostic BioSystems) を用いて封入した。蛍光の検出には、LSM 700 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss) を使用した。

3-10. プラスミドの作製

3-10-1. pGL4.42 (HRE reporter plasmid) 及び pGL4.75 plasmid (CMV promoter plasmid) の作製

本操作は Competent Quick DH5 α を用いて付属のプロトコルに準じて行った。50 μl の Competent Quick DH5 α に $1\times\text{TE}$ で 20 pg/ml に希釈したプラスミドを 1 μl 加えてピペットマンチップの先で軽く攪拌し、氷上で 5 分間静置した。 42°C で 30 秒間 heat shock 後、10 μl を LB-ampicillin agar 上に播種し、 37°C で一晩培養した。得られたコロニーを、4 ml の LB-ampicillin medium に加えて 37°C で 12 時間振盪培養した。

3-10-2. 野生型及び変異型 HSP90-HA plasmid の作製

Hsp90 HA plasmid (Addgene plasmid # 22487) [35] は William Sessa より供与されたも

のを用いた。ヒスチジン残基をアラニン残基に置換するため、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を用いて付属のプロトコルに準じて Hsp90 HA plasmid に 1 塩基変異あるいは 2 塩基変異を導入した。また、ドメインを欠損するため、KOD-Plus- Mutagenesis Kit (東洋紡績株式会社) を用いて付属のプロトコルに準じて Hsp90 HA plasmid の一部の領域を欠損した。作製した plasmid を用いて 3-10-1. に示す方法と同様の方法で Competent Quick DH5 α を形質転換し、37°C で 12 時間振盪培養後、大腸菌懸濁液のうちの 750 μ l と 60% Glycerol 250 μ l を混合し、グリセロールストックとして -80°C 保存した。残り的大腸菌懸濁液を用いて、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) の付属のプロトコルに準じて大腸菌からプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドの配列を解析 (FASMAC) し、配列が正しいことを確認した後、グリセロールストックをチップでつつき、4 ml の LB-ampicillin medium に加えて 37°C で 12 時間振盪培養した。

3-10-3. プラスミド精製

本操作は Plasmid DNA Extraction Midi Kit (Favorgen) を用いて付属のプロトコルに準じて行った。3-10-1. 及び 3-10-2. に記した方法で得られた振盪培養液の 50 μ l を 100 ml の LB-ampicillin medium に加え、37°C で 16 時間振盪培養した。得られた大腸菌培養液を室温、2,500 \times g で 20 分間遠心し、大腸菌を回収した。大腸菌ペレットを 8 ml の PM1 Buffer に再懸濁し、8 ml の PM2 Buffer を添加後、転倒混和した。室温で 5 分静置後、PM3 Buffer を 8 ml 添加して直ちに転倒混和し、4°C、20,000 \times g で 15 分間

遠心した。得られた上清を、あらかじめ PEQ Buffer を 5 ml 加えて自然落下により平衡化した PM Midi Column に添加し、自然落下させた。その後 12.5 ml の PW Buffer を自然落下させ PM Midi Column を洗浄した。カラムが空になった後、8 ml の PEL Buffer を自然落下させ、プラスミドを溶出した。このプラスミド溶出液に 2-propanol を 6 ml 加えて混和後、4°C、20,000×g で 15 分間遠心し、上清を除いた。得られたプラスミドペレットに 5 ml の 70% ethanol を加え洗浄後、4°C、20,000×g で 10 分間遠心してプラスミドを再沈殿させた。上清を除き、プラスミドペレットを 5-10 分間乾燥後、1×TE で溶解した。プラスミド濃度は NanoDrop® spectrophotometer ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

3-11. 変異型 HSP90β の Ni²⁺ に対する結合の評価

3-11-1. Transfection

本操作は FuGENE® HD Transfection Reagent 及び Polyethylenimine "Max" を用いて付属のプロトコルに準じて行った。はじめに 10% FBS-RPMI1640 または 10% FBS-DMEM 中に 2.0×10^5 cells/ml の濃度になるように調製した HEK293 細胞または HEK293FT 細胞を、6 well plate に 2 ml/well 播種した。24 時間培養後、マイクロチューブ中でまず 15-25°C の Opti-MEM 150 µl/tube に対し、1000 ng/µl のプラスミド溶液 2 µl/tube と 6 µl/tube の FuGENE® HD Transfection Reagent または Polyethylenimine "Max" をチューブの壁に付かないように溶液中に混合し、軽く転倒混和した後、室温で 15 分間静置し、transfection complex を形成した。6 well plate に播種した HEK293 細胞

または HEK293FT 細胞に全量の transfection complex を滴下し、軽く plate を揺らした後、5% CO₂ 存在下 37°C で 48 時間培養した。48 時間培養後、培養液を除き、PBS 1 ml/well で 2 回洗浄した。NTA-beads 用 lysis buffer 250 µl/well で細胞を溶解し、マイクロチューブに回収後、氷上で 10 秒間 ×2 回 sonication を行い、NTA beads 用 lysate とした。3-5-2. で示したプロトコルに準じて、Ni²⁺ 結合タンパク質及び Co²⁺ 結合タンパク質を回収した。

3-12. 統計処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表し、有意差検定は、ANOVA で有意差を確認後に Dunnett test を用いた。

4. 実験結果

4-1. ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、 NiCl_2 及び CoCl_2 が IL-8 発現に及ぼす影響 <時間依存性>

NiCl_2 及び CoCl_2 が IL-8 発現に及ぼす影響について、ヒト単球様細胞 THP-1 細胞を用いて検討した。その結果、1 mM の NiCl_2 は刺激 8 時間後以降に IL-8 mRNA 発現及び IL-8 産生を誘導し、その作用は同濃度の CoCl_2 よりも強かった (Fig. 1A and B)。IL-8 mRNA レベルは NiCl_2 刺激後 12 時間に最大となり、培養液中の IL-8 量は 24 時間まで増加したので、以下の実験では IL-8 mRNA 発現については 12 時間後、IL-8 タンパク質については 24 時間後に解析した。

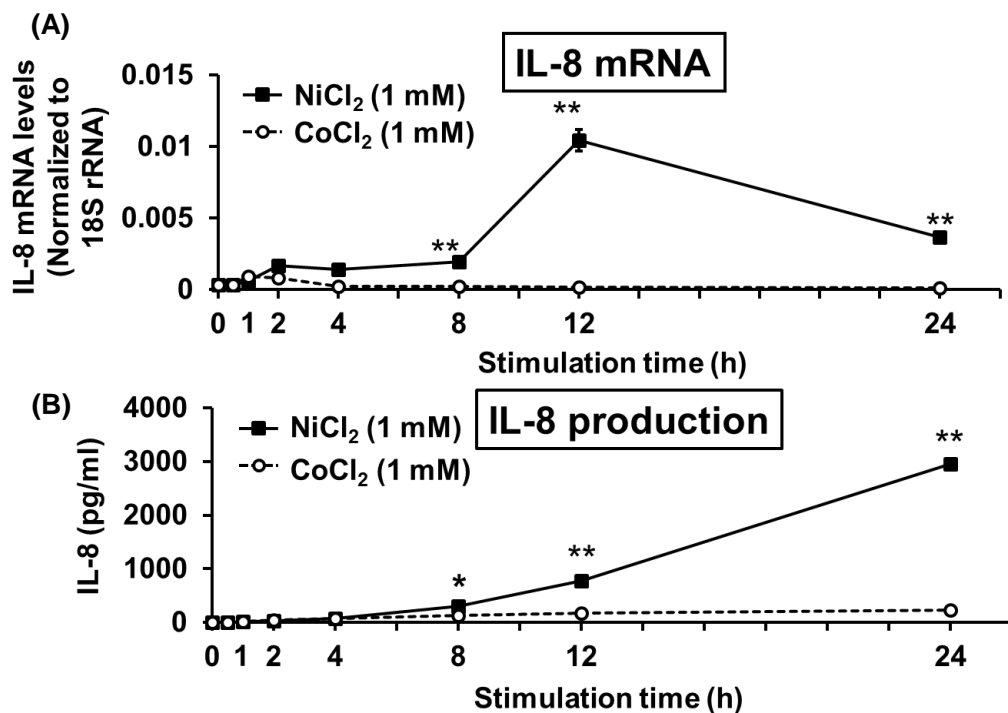


Figure 1. Effects of NiCl_2 and CoCl_2 on the expression of IL-8 in THP-1 cells.

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl_2 (1 mM) or CoCl_2 (1 mM) for the indicated time (A and B). IL-8 mRNA levels (A) and IL-8 concentrations in the medium (B) were

measured by quantitative real-time PCR and ELISA, respectively. Values are normalized to those of 18S rRNA (A). Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. 0 h (A and B). Data are representative of two independent experiments.

4-2. ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、NiCl₂ 及び CoCl₂ が IL-8 発現に及ぼす影響 <濃度依存性>

NiCl₂ 及び CoCl₂ が IL-8 発現に及ぼす影響について、それぞれの濃度依存性について検討を行った (Fig. 2A and B)。その結果、NiCl₂ は濃度依存的に IL-8 mRNA 発現及び IL-8 産生を誘導し、特に 1 mM の NiCl₂ は 0.3 mM の NiCl₂ と比較して顕著に IL-8 発現を誘導した。また、いずれの濃度においても NiCl₂ は CoCl₂ よりも IL-8 発現を誘導する作用が強いことが明らかとなった。

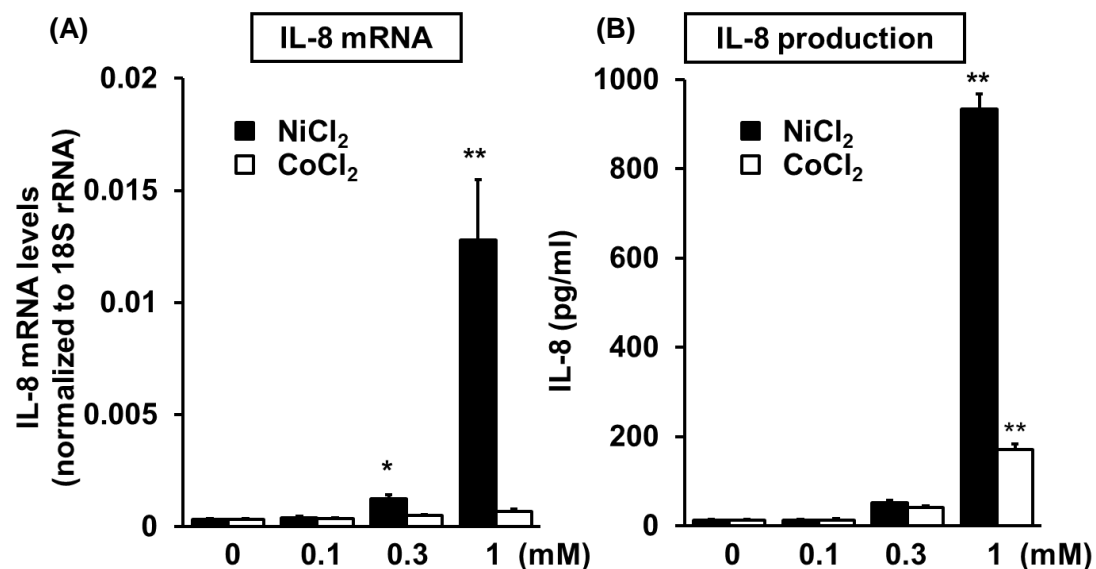


Figure 2. Effects of NiCl₂ and CoCl₂ on the expression of IL-8 in THP-1 cells.

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ or CoCl₂ (0.1, 0.3, or 1 mM) for 12 h (A) or 24 h (B). IL-8 mRNA levels (A) and IL-8 concentrations in the medium (B) were measured by quantitative real-time PCR and ELISA, respectively. Values are normalized to those of 18S rRNA (A). Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. 0 mM (A and B), # $p < 0.05$ vs. same concentration of NiCl₂. Data are representative of two independent experiments.

4-3. ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、各種金属が IL-8 発現に及ぼす影響

様々な金属が IL-8 発現に及ぼす影響について解析したところ、1 mM の FeCl₂、CoCl₂、ZnCl₂、PdCl₂ は IL-8 発現をほとんど誘導せず、NiCl₂ のみが強力な IL-8 発現誘導作用を示した (Fig. 3A and B)。

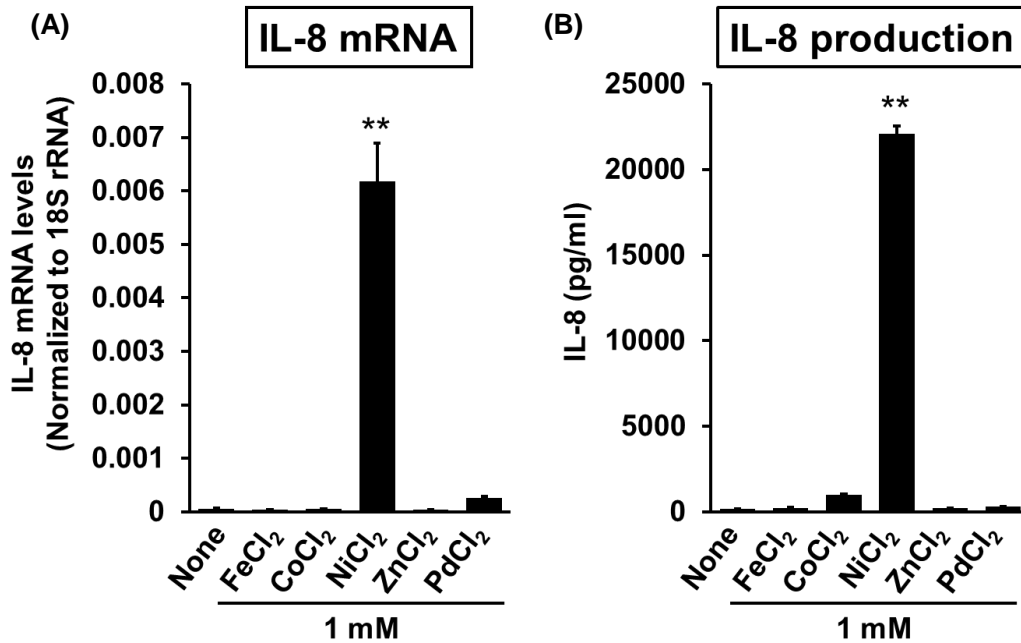


Figure 3. Effects of metal ions on the expression of IL-8 in THP-1 cells.

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM), CoCl₂ (1 mM), FeCl₂ (1 mM), ZnCl₂ (1 mM), and PdCl₂ (1 mM) for 12 h (A), or 24 h (B). IL-8 mRNA levels (A) and IL-8 concentrations in the medium (B) were measured by quantitative real-time PCR and ELISA, respectively. Values are normalized to those of 18S rRNA (A). Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. None (A and B). Data are representative of two independent experiments.

4-4. HEK293 細胞及び U937 細胞において NiCl_2 及び CoCl_2 が IL-8 発現に及ぼす影響

NiCl_2 による選択的な IL-8 発現誘導作用について、ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 細胞及びヒト単球様細胞株 U937 細胞を用いて解析した。その結果、いずれの細胞株においても、THP-1 細胞の場合と同様に、 NiCl_2 は CoCl_2 よりも強力に IL-8 mRNA 発現を誘導した (Fig. 4A and B)。

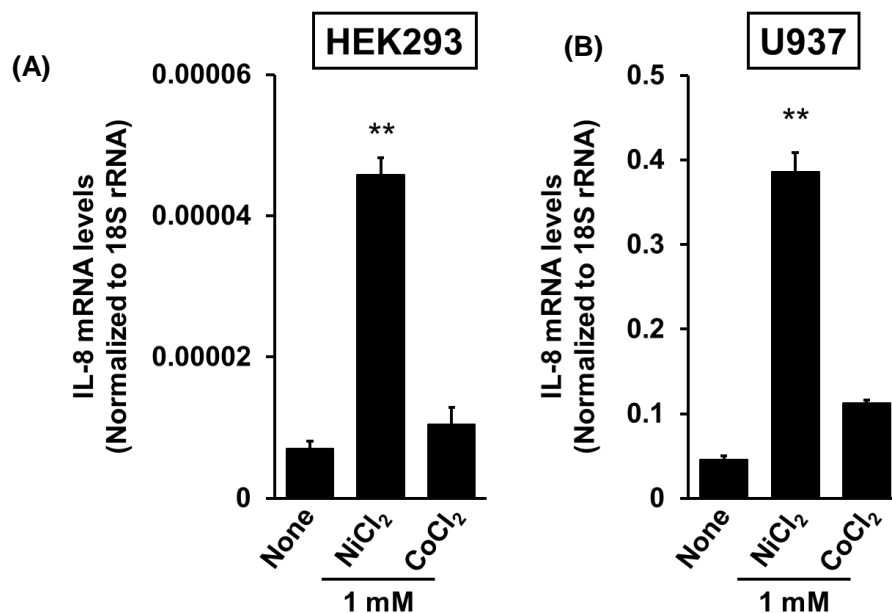


Figure 4. Effects of NiCl_2 and CoCl_2 on the expression of IL-8 in HEK293 cells and U937 cells.

HEK293 cells (A) and U937 cells (B) were incubated in medium containing NiCl_2 (1 mM) or CoCl_2 (1 mM) for 12 h and 1 h, respectively. IL-8 mRNA levels were measured by quantitative real-time PCR. Values are normalized to those of 18S rRNA. Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. None. Data are representative of two independent experiments.

4-5. NiCl₂ 及び CoCl₂ による HIF-1 α 発現誘導作用

NiCl₂ 及び CoCl₂ による IL-8 発現誘導における HIF-1 α の関与を明らかにするために、まず HIF-1 α の発現量に対する NiCl₂ 及び CoCl₂ の効果について Western blotting により解析した。その結果、NiCl₂ 及び CoCl₂ はいずれも HIF-1 α 発現量を増加させたが、その作用は CoCl₂ の方が強かった (Fig. 5)。

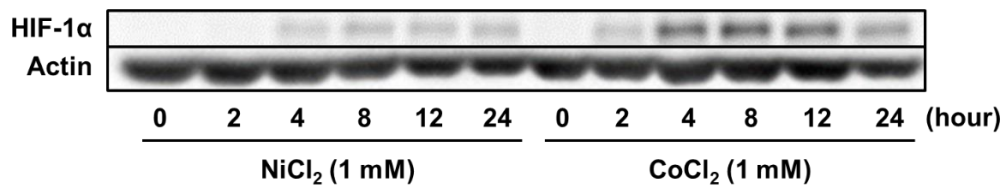


Figure 5. Effects of NiCl₂ and CoCl₂ on the expression of HIF-1 α .

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM) or CoCl₂ (1 mM) for the indicated time. The protein levels of HIF-1 α and actin were determined by immunoblotting. Data are representative of three independent experiments.

4-6. NiCl_2 及び CoCl_2 による IL-8 及び VEGF 発現誘導に対する HIF-1 α 阻害薬の効果

次に、HIF-1 α 阻害薬 PX-478 が NiCl_2 及び CoCl_2 による IL-8 発現誘導に及ぼす影響について解析した。PX-478 は HIF-1 α 発現誘導を抑制し (Fig. 6A)、 NiCl_2 による IL-8 発現誘導を mRNA レベル及びタンパク質レベルで顕著に抑制したが、 CoCl_2 による IL-8 発現誘導には影響を及ぼさなかった (Fig. 6B-D)。また、HIF-1 α によって発現が誘導される VEGF mRNA についても同様に解析したところ、 NiCl_2 は CoCl_2 よりも強力に VEGF mRNA 発現を誘導した。また、いずれの VEGF 発現も PX-478 によって顕著に抑制された (Fig. 6E)。

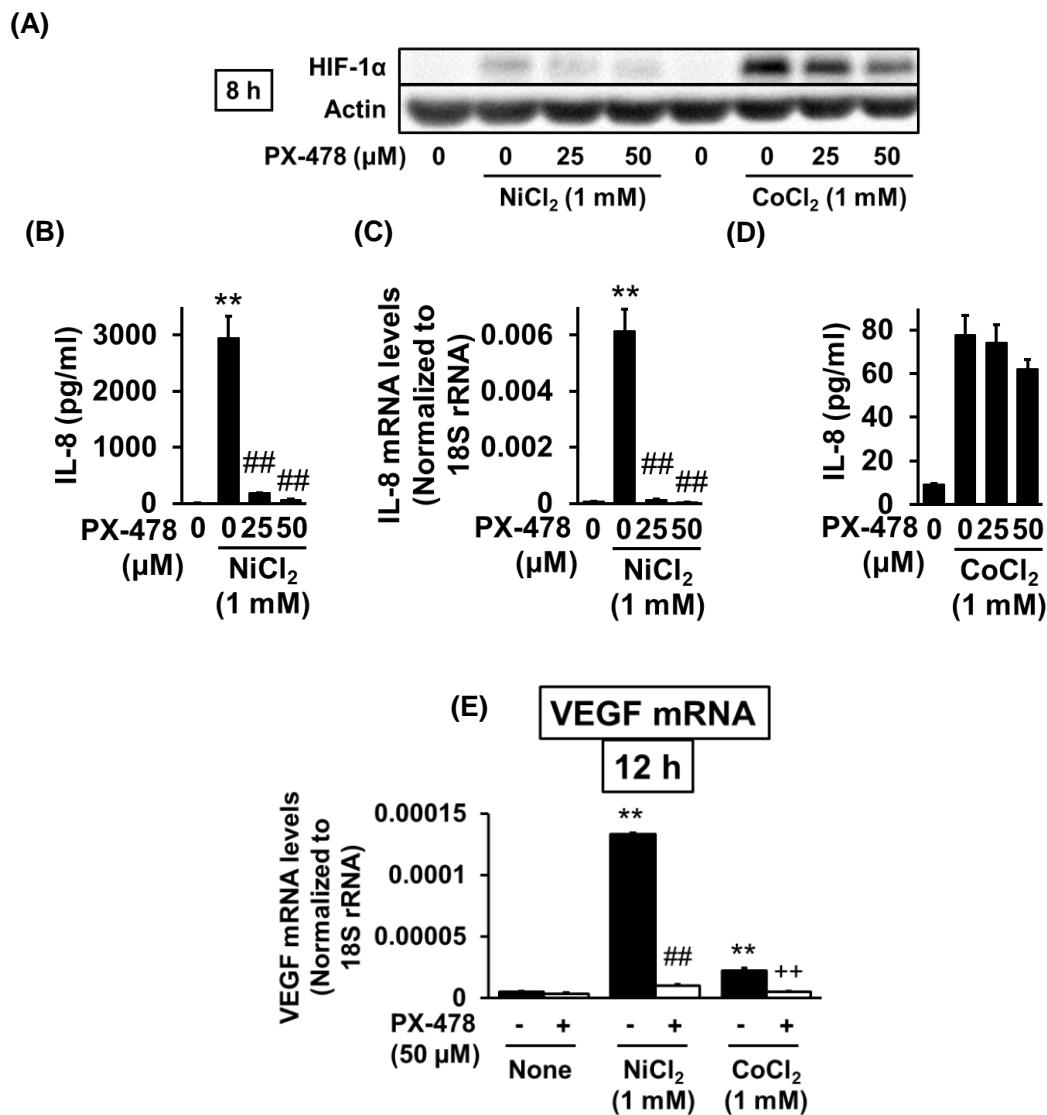


Figure 6. Effects of HIF-1α on the NiCl₂- or CoCl₂-induced expression of IL-8 and VEGF.

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM), CoCl₂ (1 mM), or PX-478 (25 and 50 μM) for the indicated time. The protein levels of HIF-1α and actin were determined by immunoblotting (A). IL-8 concentrations in the medium (B and D) and IL-8 mRNA levels (C) or VEGF mRNA levels (E) were measured by ELISA and quantitative real-time PCR, respectively. Values are normalized to those of 18S rRNA (C and E). Data represent the mean ± S.E.M. (*n* = 3). ***p* < 0.01 vs. None (B, C, and E) and ##*p* < 0.01 vs. NiCl₂ (1 mM) (B, C, and E), ++*p* < 0.01 vs. CoCl₂ (1 mM) (E). Data are representative of two independent experiments.

4-7. 低酸素による IL-8 及び VEGF 発現誘導作用

低酸素刺激による IL-8 及び VEGF mRNA 発現誘導作用を NiCl₂ 及び CoCl₂ と比較した。まず HIF-1 α の発現量を Western blotting により解析したところ、CoCl₂ 及び低酸素 (1% O₂) 刺激は CoCl₂ ほどではないものの NiCl₂ よりも強力に HIF-1 α 発現量を増加させた (Fig. 7A)。一方、低酸素刺激による IL-8 mRNA 及び VEGF mRNA 発現誘導作用は NiCl₂ よりも弱く、CoCl₂ と同程度だった (Fig. 7B and C)。

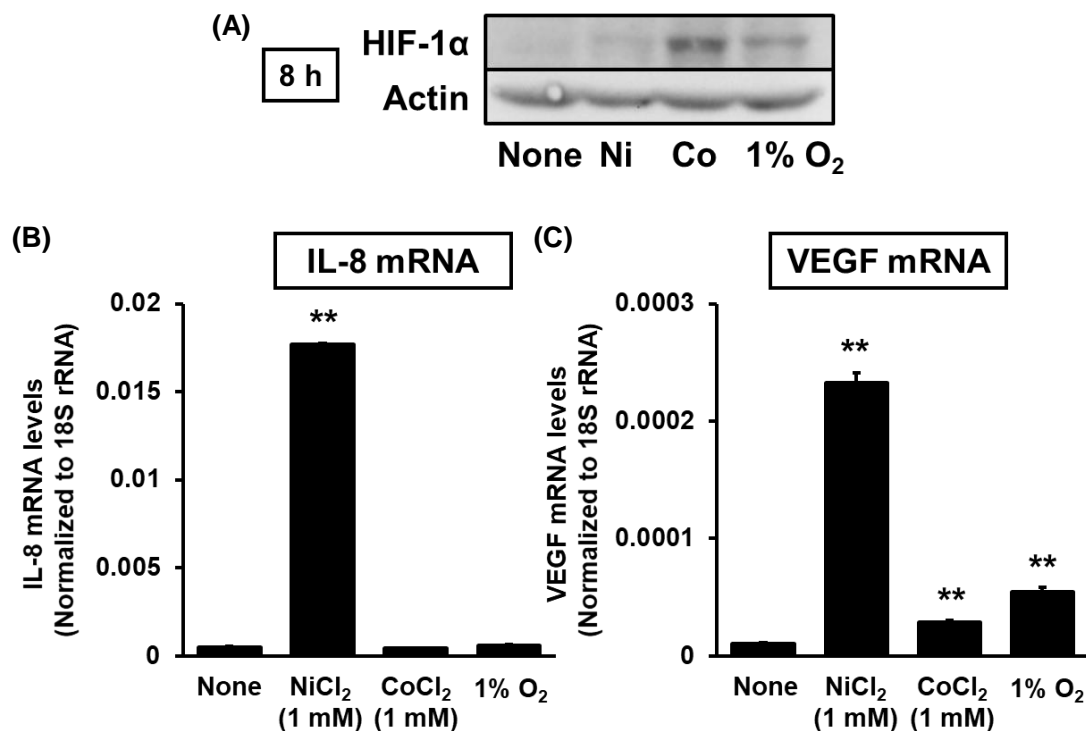


Figure 7. Effects of HIF-1 α on the NiCl₂-, CoCl₂-, or hypoxia-induced expression of IL-8 and VEGF.

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM) or CoCl₂ (1 mM) and under 1% O₂ for 8 h (A) or 12 h (B and C). The protein levels of HIF-1 α and actin were determined by immunoblotting (A). IL-8 mRNA levels (B) or VEGF mRNA levels (C) were measured by quantitative real-time PCR. Values are normalized to those of 18S rRNA (B and C). Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. None (B and C).

4-8. NiCl_2 及び CoCl_2 による $\text{HIF-1}\alpha$ の転写活性化作用

NiCl_2 及び CoCl_2 が $\text{HIF-1}\alpha$ の転写活性発現に及ぼす影響について、 $\text{HIF-1}\alpha$ の結合領域 (HRE) の下流に luciferase の転写領域が存在する reporter plasmid を用いて、luciferase assay により解析した。その結果、 NiCl_2 は有意に $\text{HIF-1}\alpha$ による転写を誘導したのに対し、同濃度の CoCl_2 はこの作用を示さなかった (Fig. 8)。

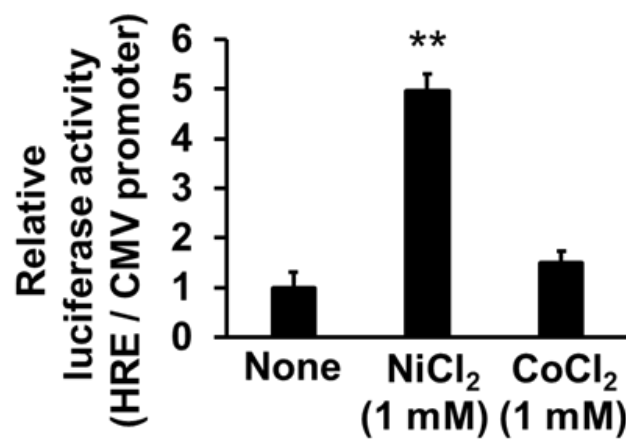


Figure 8. Effects of NiCl_2 or CoCl_2 on the activation of HRE

THP-1 cells were transfected with pGL4.42 (HRE reporter plasmid) and pGL4.75 (CMV promoter plasmid) for 48 h. THP-1 cells were then incubated in medium containing NiCl_2 (1 mM) or CoCl_2 (1 mM) for 12 h. Luciferase activity was determined in these cells. Values are normalized to those of Renilla luciferase activity and the mean value of the control was set to 1.0. Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3-4$). ** $p < 0.01$ vs. None. Data are representative of three independent experiments.

4-9. NiCl₂ による IL-8 発現誘導に対する TLR4 阻害薬の効果

NiCl₂ による IL-8 発現誘導に対する TLR4 阻害薬 TAK-242 の効果を HIF-1 α 阻害薬 PX-478 と比較し、経時的な HIF-1 α 及び TLR4 の関与について解析した。その結果、TAK-242 は NiCl₂ 刺激 2 時間後の IL-8 mRNA レベル及び 8 時間後の上清中 IL-8 量を有意に低下させた。この時間では、PX-478 は IL-8 発現を抑制しなかった。一方、NiCl₂ 刺激 12 時間後の IL-8 mRNA レベル及び 24 時間後の IL-8 産生量は、Fig. 5 で示したように PX-478 により顕著に抑制されたが、TAK-242 は部分的な抑制作用しか示さなかった (Fig. 9A-D)。

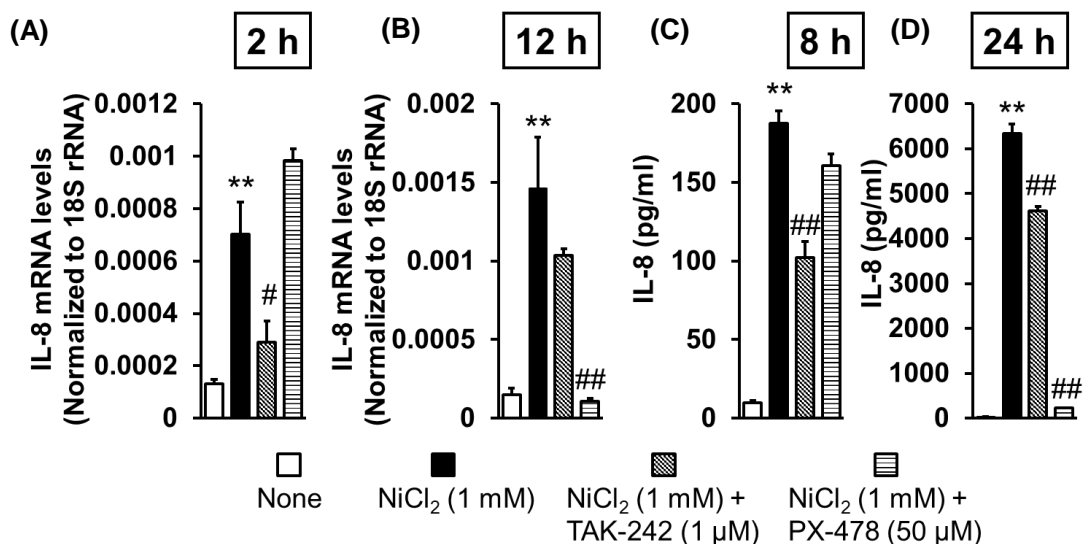


Figure 9. Effects of HIF-1 α and TLR4 on the NiCl₂-induced expression of IL-8.

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM), CoCl₂ (1 mM), TAK-242 (1 μM), or PX-478 (50 μM) for the indicated time. IL-8 mRNA levels (A and B) and IL-8 concentrations in the medium (C and D) were measured by quantitative real-time PCR and ELISA, respectively. Values are normalized to those of 18S rRNA (A and B). Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. None (A-D), # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. NiCl₂ (1 mM) (A-D). Data are representative of two independent experiments.

4-10. NiCl₂ 及び LPS による IL-8 発現誘導の経時変化の相違

TLR4 のリガンドである LPS と NiCl₂ の作用について比較したところ、LPS は刺激 2 時間後をピークに IL-8 mRNA 発現を一過性に誘導したのに対し、NiCl₂ は刺激 12 時間後に最も強く IL-8 mRNA 発現を持続的に誘導した (Fig. 10A)。また、タンパク質レベルにおいても LPS は NiCl₂ よりも早く IL-8 産生を誘導した (Fig. 10B)。

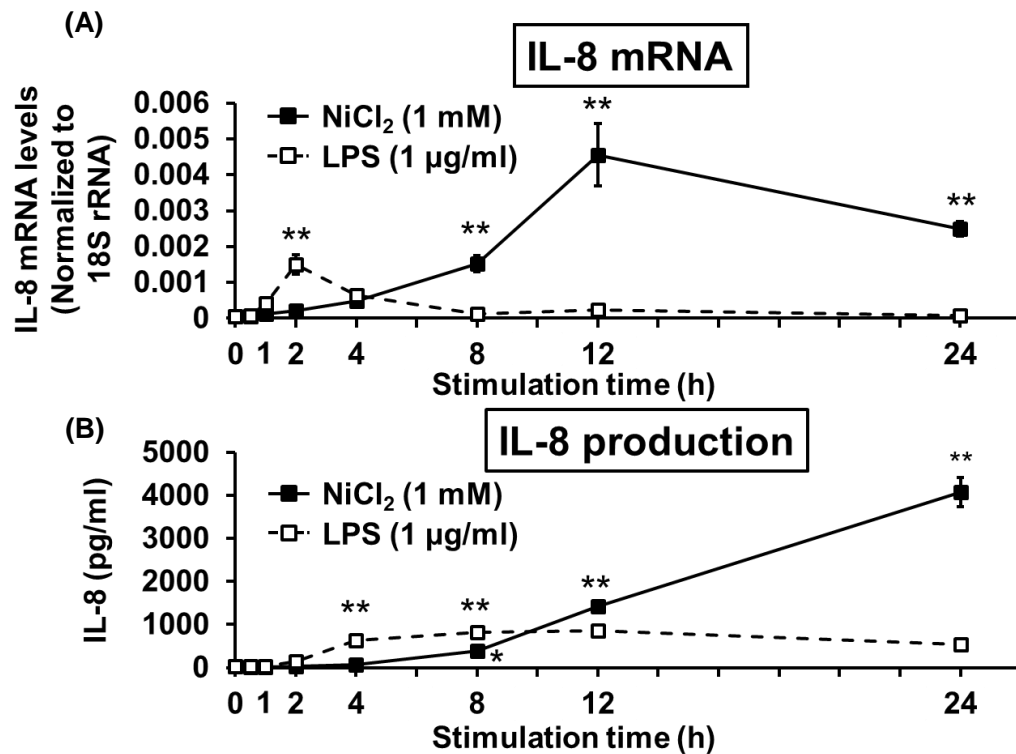


Figure 10. Time course of IL-8 expression induced by NiCl₂ and LPS.

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM) and LPS (1 µg/mL) for the indicated time. IL-8 mRNA levels (A) and IL-8 protein levels in the medium (B) were determined by quantitative real-time PCR and ELISA, respectively. Values are normalized to those of 18S rRNA (A). Data represent the mean ± S.E.M. (*n* = 3). **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 vs. 0 h. Data are representative of two independent experiments.

4-11. Ni^{2+} に選択的に結合するタンパク質の同定

NiCl_2 が CoCl_2 よりも強力に IL-8 発現を誘導するため、 Ni^{2+} に選択的に結合するタンパク質が IL-8 発現誘導作用に関与していると考え、 Ni^{2+} に選択的に結合するタンパク質を探索した。Beads 表面に Ni^{2+} 及び Co^{2+} が結合した Ni-NTA beads 及び Co-NTA beads を THP-1 細胞の lysate と混合し、beads の表面に結合したタンパク質を SDS-PAGE により分離して銀染色を行った。その結果、分子量 90 kDa の付近に、 Ni^{2+} に選択的に結合するタンパク質が見出された。このタンパク質を切り出し、トリプシン消化後、LC/MS/MS により解析したところ、HSP90 β が同定された (Fig. 11)。

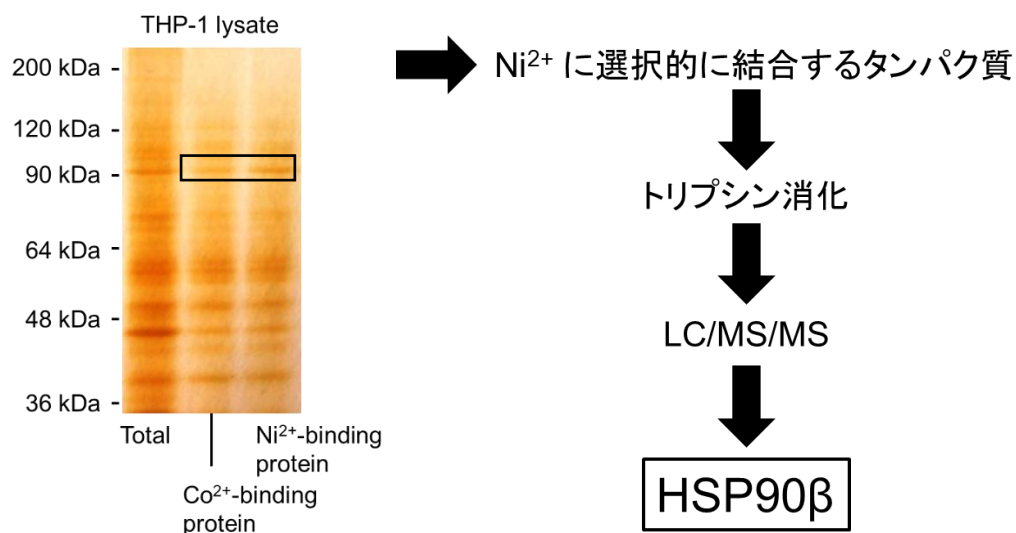


Figure 11. Identification of HSP90 β as a Ni^{2+} -selective binding protein.

Cell lysates were incubated for 1 h with Ni-NTA or Co-NTA beads. Proteins bound to the beads were eluted by imidazole, separated using SDS-PAGE, and stained by silver stain. The protein indicated by a rectangle was digested by trypsin, and identified as HSP90 β by LC/MS/MS.

4-12. HSP90 β と Ni²⁺ の結合

HSP90 β が Ni-NTA beads に選択的に結合していることを Western blotting により確認した。Ni²⁺ や Co²⁺ に結合しないと考えられる actin はいずれの beads にも結合しないことが確認された。この条件下で、HSP90 β は Co-NTA beads にはわずかに結合するものの、Ni-NTA beads により選択的に結合した (Fig. 12A)。また、HSP90 β 自身が直接 Ni-NTA beads に結合するかを明らかにするために、recombinant HSP90 β を用いて同様に解析したところ、recombinant HSP90 β の Ni-NTA beads への結合が確認された。また、L-lactate dehydrogenase 及び pyruvate kinase の標準品は Ni-NTA beads と Co-NTA beads の両方に結合した (Fig. 12B and C)。

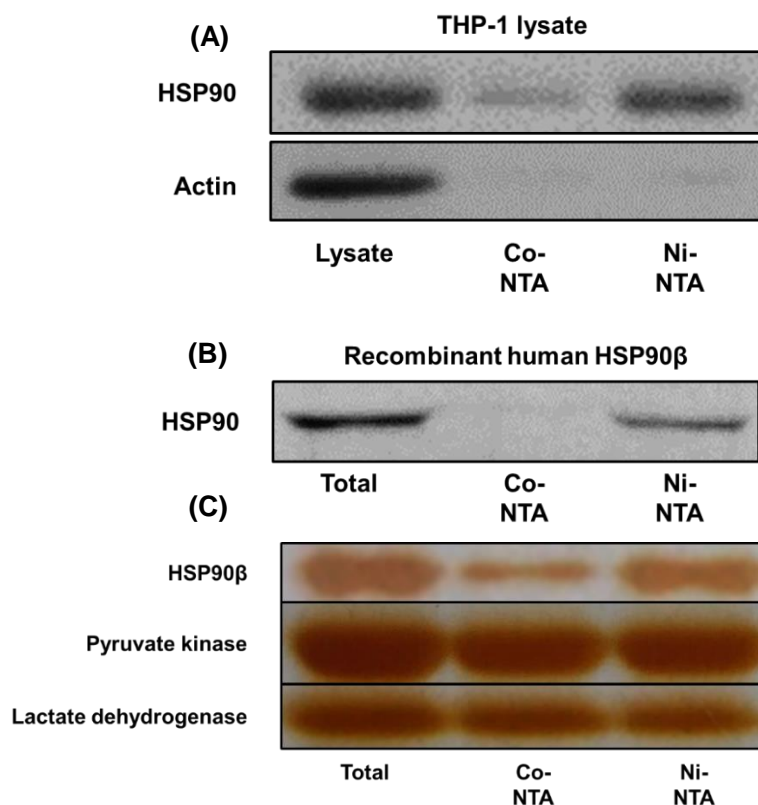


Figure 12. Binding of HSP90 β and Ni²⁺.

(A) HSP90 and actin in the cell lysate and proteins binding to NTA-beads were detected by immunoblotting. (B and C) Recombinant human HSP90 β , L-lactate dehydrogenase, and pyruvate

kinase (1 μ g) were incubated for 1 h with NTA, Ni-NTA, or Co-NTA beads. Proteins bound to beads were eluted by imidazole and analyzed by immunoblotting (B) and silver stain (C).

4-13. HSP90 β 、HIF-1 α 、HIF-1 β の相互作用に及ぼす NiCl₂ 及び CoCl₂ の影響

HIF-1 α は HSP90 β と結合することで細胞質に留まり、HIF-1 β と結合することで核内に移行して転写活性化が誘導される。NiCl₂ が HSP90 β 、HIF-1 α 、及び HIF-1 β の相互作用に影響を及ぼす可能性について、免疫沈降法により検討した。まず細胞内の各タンパク質の発現量について解析したところ、NiCl₂ 及び CoCl₂ は HIF-1 α 発現量を増加させたが、HSP90 β 及び HIF-1 β の発現量には影響を及ぼさなかった (Fig. 13A)。HIF-1 α で免疫沈降し、HIF-1 α に結合した HSP90 β 量を Western blot により検出したところ、CoCl₂ は NiCl₂ よりも強力に HIF-1 α と HSP90 β との結合を誘導することが明らかになった (Fig. 13B)。また、HIF-1 β で免疫沈降を行い、HIF-1 β に結合する HIF-1 α 量を解析したところ、NiCl₂ は CoCl₂ よりも強力に HIF-1 α と HIF-1 β の結合を増加させることが明らかになった (Fig. 13C)。

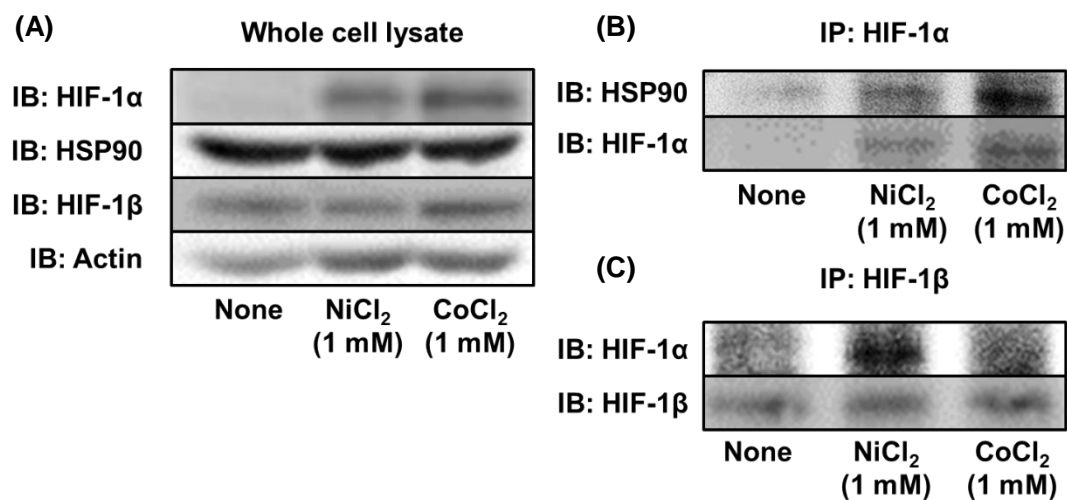


Figure 13. Effect of NiCl₂ and CoCl₂ on the binding of HIF-1 α to HIF-1 β and to HSP90.

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM) or CoCl₂ (1 mM) for 8 h, and then lysates were prepared. HIF-1 α (B) and HIF-1 β (C) in the lysates were immunoprecipitated (IP). Protein levels of HIF-1 α , HIF-1 β , HSP90, and actin in whole cell lysates (A) and immunoprecipitated proteins (B and C) were determined by immunoblotting (IB). Data are representative of three independent experiments.

4-14. HIF-1 α 、HIF-1 β の核内移行に及ぼす NiCl₂ 及び CoCl₂ の影響

NiCl₂ 及び CoCl₂ が HIF-1 α 及び HIF-1 β の核内移行に及ぼす影響について、細胞質タンパク質及び核内タンパク質を分画後、それぞれのタンパク質の局在を Western blotting により解析した。細胞質タンパク質マーカーとして α -tubulin を、核内タンパク質のマーカーとして laminin B を検出した。その結果、NiCl₂ 及び CoCl₂ はいずれも HIF-1 α 及び HIF-1 β の核内分布量を増加させるが、その作用は NiCl₂ の方が強力であることが明らかになった (Fig. 14)。

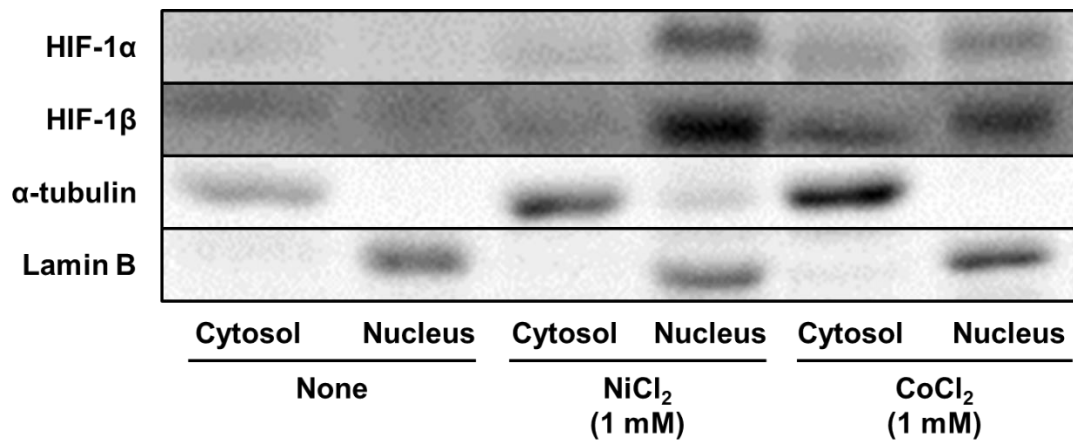


Figure 14. Effect of NiCl₂ and CoCl₂ on the nuclear localization of HIF-1 α and HIF-1 β .

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM) or CoCl₂ (1 mM) for 8 h. After stimulation, cytoplasmic and nuclear proteins were separated, and the levels of HIF-1 α , HIF-1 β , α tubulin, and lamin B were determined by immunoblotting.

4-15. HIF-1 α 、HIF-1 β の核内移行に及ぼす NiCl₂ 及び CoCl₂ の影響

NiCl₂ 及び CoCl₂ による HIF-1 α の核内移行について、免疫染色法により解析した。その結果、共に 8 時間後の HIF-1 α 発現量を増加させたが、NiCl₂ 刺激の場合には核内の HIF-1 α 量が顕著に増加し、CoCl₂ 刺激の場合は主に細胞質に検出された (Fig. 15)。

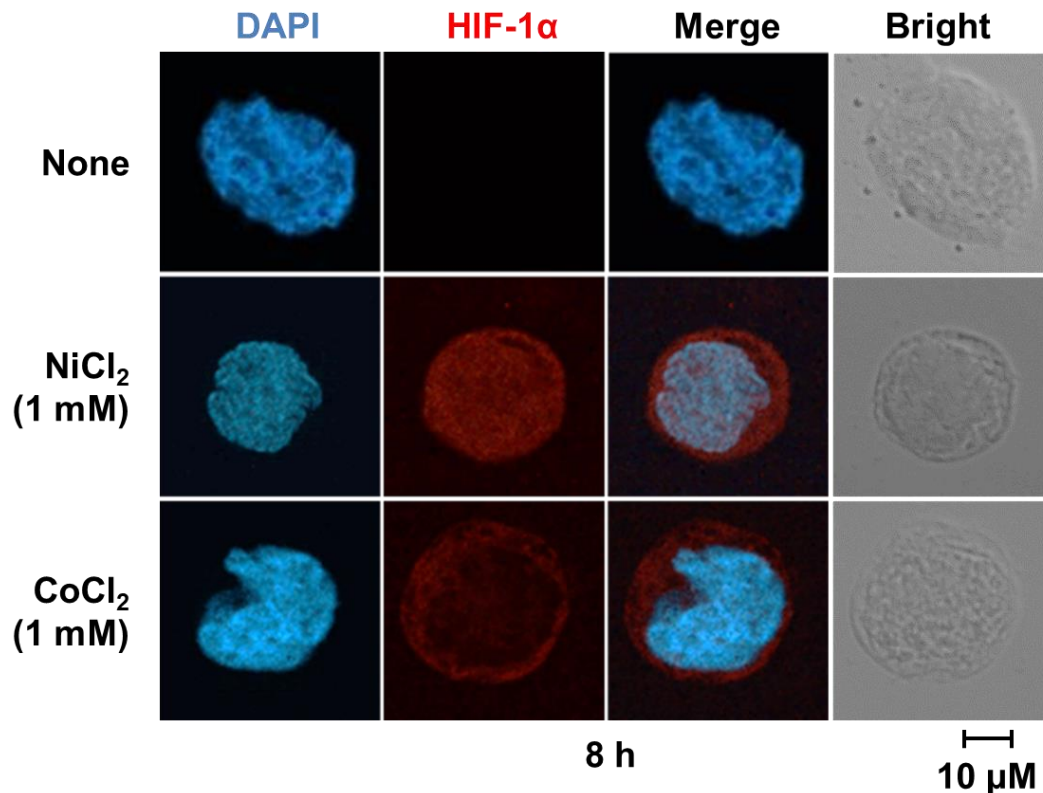


Figure 15. Effect of NiCl₂ and CoCl₂ on the nuclear localization of HIF-1 α and HIF-1 β .

THP-1 cells were incubated in medium containing NiCl₂ (1 mM) or CoCl₂ (1 mM) for 8 h. After stimulation, HIF-1 α was immunostained (red) and the nuclei were stained with DAPI (blue). Stained cells were visualized by laser confocal microscopy. Data are representative of three independent experiments.

4-16. Ni^{2+} と HSP90 β の結合におけるヒスチジン残基の寄与

HSP90 β の Ni^{2+} 結合部位を同定するために、HSP90 β の 13 個のヒスチジン残基をアラニン残基に置換した HSP90 β 変異体発現用ベクターを作製し、各 HSP90 β 変異体と Ni^{2+} の結合について Fig.11 と同様に解析した。その結果、いずれのヒスチジン変異体も Ni^{2+} に対する結合能は減弱しなかった (Fig. 16)。また、2 個のヒスチジン残基をアラニン残基に置換した場合も、 Ni^{2+} に対する結合能は減弱しなかった (Fig. 16)。

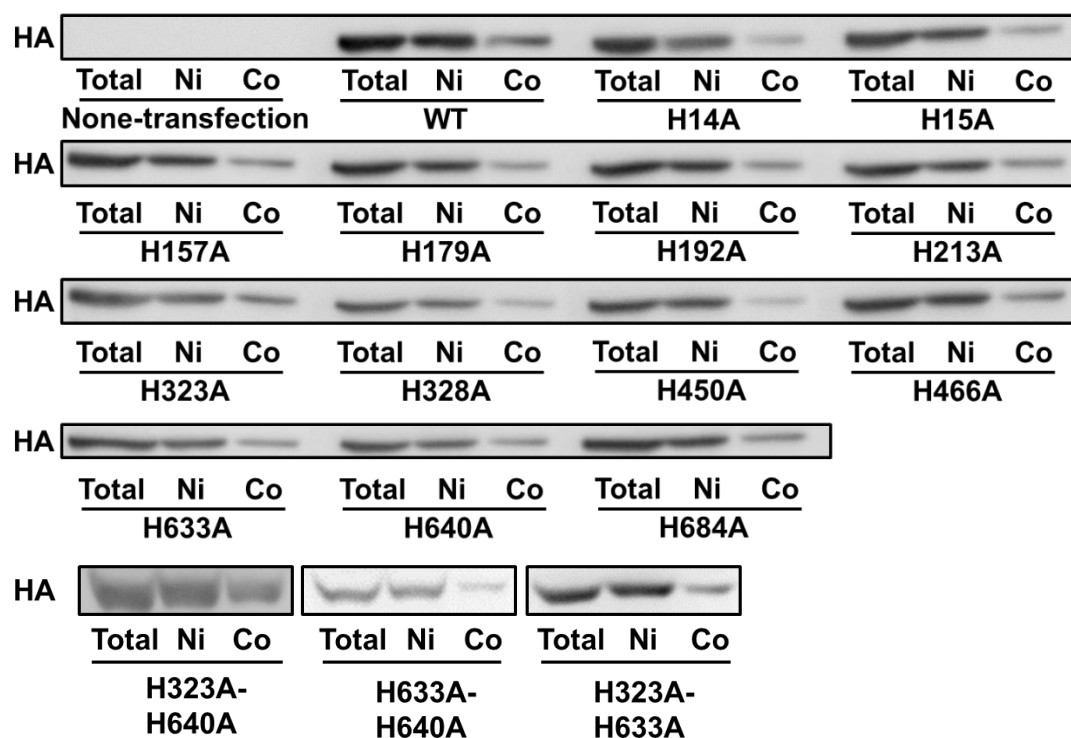


Figure 16. Analysis of Ni^{2+} -binding domains of HSP90 β .

Mutated HSP90 β variants, in which each histidine residue was changed to alanine residue, were expressed in HEK293 cells, and the lysates were incubated for 1 h with Ni-NTA or Co-NTA beads. Mutated variants that bound to beads were analyzed by immunoblotting.

4-17. Ni^{2+} と結合する HSP90 β の各ドメインの探索

次に、HSP90 β の各ドメインを欠損した HSP90 β 変異体発現用ベクターを作製し、HSP90 β と Ni^{2+} の結合について解析した。その結果、dimerization domain (556-724) 及び middle domain (261-555) を欠損した HSP90 β は Ni^{2+} に対して選択的に結合する一方、linker domain (216-260) を含まず、ATP binding domain (1-215)、あるいは middle domain (261-555) のみの場合には、 Ni^{2+} に対する結合能が減弱した。また、ATP binding domain (1-215) のみを欠損させた HSP90 β は Ni^{2+} に対する結合能は変化しなかったが、ATP binding domain (1-215) 及び linker domain (216-260) を欠損した HSP90 β は Ni^{2+} に対する結合能が減弱することが明らかになった。Dimerization domain (556-724) のみの場合も、 Ni^{2+} に対して結合しなかった (Fig. 17)。

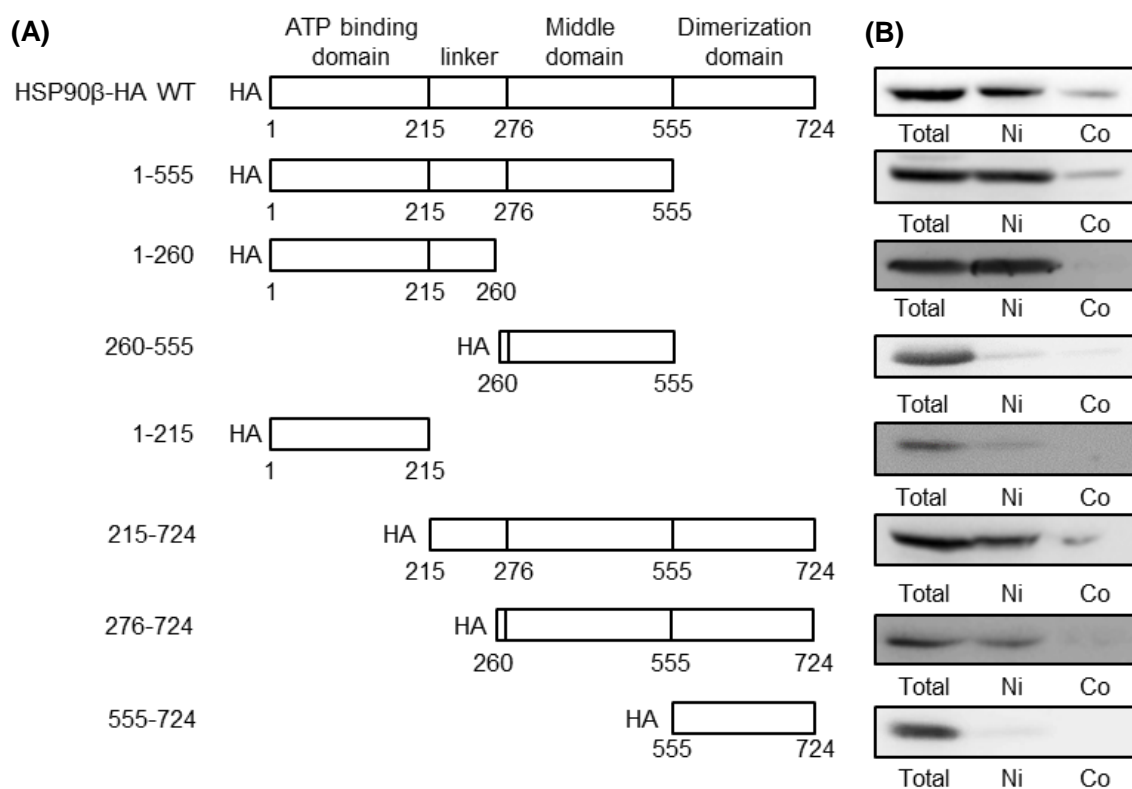


Figure 17. Analysis of Ni^{2+} -binding domains of HSP90 β .

Domain-deleted HSP90-HA variants were designed as described in (A). (B) The variants were expressed in HEK293FT cells, and lysates were incubated for 1 h with Ni-NTA or Co-NTA beads. Proteins bound to the beads were analyzed by immunoblotting.

5. 考察

本研究は、ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、 Ni^{2+} は Co^{2+} に比べて HIF-1 α の発現量を増加させる作用は弱いものの、強く IL-8 産生を誘導する機序として、 Ni^{2+} が HSP90 β の linker domain に結合し、HSP90 β 及び HIF-1 α の結合を阻害することによって、HIF-1 α と HIF-1 β の核内移行及び転写活性化を促進する作用を持つことを発見した。

本研究ではまず、THP-1 細胞において、様々な金属イオンのうち、 Ni^{2+} のみが強力な IL-8 発現誘導作用を持つことを発見した。Ni アレルギー患者数は、他の金属アレルギー一患者数よりも多いことや [4]、 Ni^{2+} は他の金属イオンよりも炎症性遺伝子発現を誘導する作用が強いこと [36] が知られており、生体内においても Ni^{2+} が他の金属イオンと比較して強力に炎症反応を誘発することで、アレルギーへの進展を誘導すると考えられる。THP-1 細胞においても同様に Ni^{2+} 特有の IL-8 発現誘導作用が見られたことから、そのメカニズムを解明することで、 Ni^{2+} による炎症・アレルギー誘発作用の最初のステップの反応機構の解明につながると考え、より詳細にメカニズムを解析した。

Ni^{2+} による IL-8 発現誘導作用の濃度依存性について解析したところ、0.3 mM の Ni^{2+} は IL-8 発現をわずかに誘導したのに対し、1 mM の Ni^{2+} は IL-8 発現を強力に誘導したため、 Ni^{2+} は 1 mM の濃度になって初めて IL-8 発現を強力に誘導する作用を発揮することが示唆された。これまでの報告においても、0.3 mM の Ni^{2+} と比較して、1 mM の Ni^{2+} がヒト T 細胞からの IL-8 発現を顕著に誘導すること [37] や、 Ni^{2+} が 0.25 mM よりも高濃度になるとヒト末梢血単核球や THP-1 細胞からの IL-8 発現を誘導すること [38] が報告されている。これらのことから、ステント等に接着した白血球が高濃度の Ni^{2+} に曝露されることによって、顕著に IL-8 発現が誘導されることで強力に炎症を誘発する可能性が考えられる。

Ni^{2+} による IL-8 発現誘導作用機構を解析するため、 Ni^{2+} により活性化すると考えられる TLR4 と HIF-1 α の 2 つのタンパク質に着目して解析を行った。これまで、 Ni^{2+}

はヒト TLR4 [8] や HIF-1 α [19] を活性化することで IL-8 等の炎症性遺伝子発現を誘導することが明らかとなっているが、それぞれがどの程度 IL-8 発現に対して寄与するかは厳密には明らかではない。TLR4 が活性化すると NF- κ B 経路や MAPK 経路の活性化を介して AP-1 や NF- κ B などの転写因子が活性化される [39]。IL-8 のプロモーター領域には NF- κ B、AP-1 及び HIF-1 α の結合配列があり [17]、TLR4 と HIF-1 α がいずれも IL-8 発現誘導に関与する可能性が考えられる。本研究は、TLR4 と HIF-1 α の活性化を阻害する阻害薬を用いて、THP-1 細胞において、TLR4 が Ni²⁺ による早期の IL-8 発現誘導に関与し、HIF-1 α がより遅い時間での強力な IL-8 発現誘導に関与することを明らかにした。また、LPS は刺激 2 時間後で IL-8 mRNA 発現を強く誘導する一方、Ni²⁺ は刺激 12 時間後において IL-8 mRNA 発現を最も強く誘導したことから、TLR4 は早期の IL-8 発現誘導に関与することが確認された。HIF-1 α の発現量は Ni²⁺ 刺激 2 時間後でわずかに上昇し、刺激 8 時間後で最も強く誘導されるため、Ni²⁺ による IL-8 mRNA 発現誘導は刺激 2-4 時間後では TLR4 の活性化により弱く誘導され、刺激 8 時間後以降に HIF-1 α の活性化により強く誘導されと考えられる。THP-1 細胞は未分化の単球様の状態では、分化したマクロファージ様の状態と比較して、TLR4 の感受性が低いため、今回の検討では HIF-1 α による IL-8 発現誘導作用がより顕著に確認されたと考えられる。TLR4 の感受性が高い細胞や、TLR4 を発現しない細胞など、細胞の違いによって Ni²⁺ による炎症性遺伝子発現誘導機構は変化すると考えられる。ヒトの primary monocytes などを用いた検討が必要ではあるが、この結果は、血中の単球は Ni²⁺ に反応して、持続的に炎症性遺伝子発現を誘導する可能性を示唆した。

HIF-1 α 発現量誘導作用は Co²⁺ の方が Ni²⁺ よりも強力であるが、転写活性化作用は Ni²⁺ の方が Co²⁺ よりも強力であることが明らかとなった。さらに、HIF-1 α によって発現が誘導される VEGF mRNA 発現に対する Ni²⁺ 及び低酸素の影響を確認したところ、Ni²⁺ の VEGF mRNA 発現誘導作用は低酸素刺激より強力である一方、HIF-1 α 発現量誘導作用は低酸素刺激の方が強いことを明らかにした。これらのことから、Ni²⁺ の

HIF-1 α 転写活性化作用は Ni²⁺ に特有のものであることが示唆された。Ni²⁺ と Co²⁺ の PHD2 活性抑制作用の強さは、細胞の種類や金属イオン濃度により異なるが、これまでの報告では明らかな相違は認められていない [19]。そのため、この結果は Ni²⁺ が PHD2 の抑制作用以外の作用で HIF-1 α を活性化することを示唆したものであり、Ni²⁺ 特有の HIF-1 α 活性化作用を示した初めての報告である。金属イオンによる HIF-1 α 活性化作用の相違は、IL-8 などの炎症性遺伝子発現誘導作用の相違につながり、Ni²⁺ が他の金属イオンよりも炎症・アレルギー誘発作用が強い原因となる可能性がある。

Ni²⁺ が Co²⁺ よりも強力に HIF-1 α を活性化することが示唆されたため、Ni²⁺ に選択的に結合する結合タンパク質に着目して解析を行った。Ni²⁺ 結合タンパク質についてはいくつか報告されており、ヒト B 細胞 [40] や肺炎レンサ球菌 [6] において、多くのタンパク質が Ni²⁺ と結合することが報告されている。さらにマウスにおいて、血小板第 4 因子 CXCL4 は Ni²⁺ と結合することで、Ni アレルギーを増強すること [41] や、ヒト TLR4 は Ni²⁺ と結合して炎症を誘発すること [18] が明らかとなっている。また、ヒト血清アルブミンは Ni²⁺ と結合することで抗原性を獲得し、Ni²⁺ 特異的 T 細胞の分化を誘導する [42]。一方、TLR4 は同様に Co²⁺ に結合すること [18] や、多くの Ni²⁺ 結合タンパク質は Co²⁺ にも結合すること [6] が明らかとなっている。本研究においても、L-lactate dehydrogenase や pyruvate kinase は Ni²⁺ と Co²⁺ のいずれにも結合することが確認された。そのため、Ni²⁺ に選択的に結合するタンパク質は、強力な IL-8 発現誘導作用に重要であると考えられるが、そのようなタンパク質の種類は少なく、いまだ報告はされていない。本研究では、Ni²⁺ と Co²⁺ の IL-8 発現誘導作用の相違に着目した初めての研究であり、Ni-NTA beads 及び Co-NTA beads を用いることで、Ni²⁺ のみに特有の標的タンパク質として HSP90 β を同定することができた。

HSP90 β は HIF-1 α の活性化に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。HIF-1 α は HSP90 β 及び HIF-1 β と競合的に結合するが、HSP90 β に結合すると細胞質に留まりその発現量が上昇し、HIF-1 β と結合すると核内移行及び転写活性化が誘導される。

そのため、 Ni^{2+} が HSP90 β に結合することでこれらのタンパク質相互作用に影響を及ぼすと考え解析を行ったところ、 Ni^{2+} が Co^{2+} と比較して HSP90 β と HIF-1 α の結合を阻害し、HIF-1 β と HIF-1 α の結合を促進することを明らかにした。さらに、 Ni^{2+} が HIF-1 α と HIF-1 β の結合を誘導する結果、その核内移行及び転写活性化も誘導すると考えられたため、解析を行ったところ、 Ni^{2+} は Co^{2+} と比較して HIF-1 α 及び HIF-1 β の核内移行及び転写活性化を誘導することが確認された。

Ni^{2+} や Co^{2+} はヒスチジン残基に結合することが明らかとなっている。いずれの金属イオンも TLR4 のヒスチジン残基に結合してこれを活性化すること [8] や、肺炎レンサ球菌において、 Ni^{2+} 結合タンパク質及び Co^{2+} 結合タンパク質中のアミノ酸の出現頻度を解析した結果、これらの結合タンパク質中では、全てのタンパク質と比較して、ヒスチジン残基の出現頻度が有意に上昇すること [40] が報告されている。しかしながら、ヒスチジン変異体と Ni^{2+} との結合について解析を行ったところ、HSP90 β と Ni^{2+} の結合には、いずれのヒスチジン残基も関与していないことが示唆された。一方で、 Ni^{2+} が HSP90 β の linker domain に結合することが示唆された。HSP90 β の linker domain はタンパク質相互作用に重要な働きを担っていることが明らかとなっている。HSP90 β は co-chaperone と呼ばれる cdc37 と結合することで、タンパク質の構造を変化させる活性を発揮できるが、HSP90 β の linker domain は cdc37 との結合に必要な部位であることが報告されている [43]。このことから、 Ni^{2+} が linker domain に結合することでその構造を変化させ、HIF-1 α と HSP90 β との結合に影響を及ぼした可能性が考えられる。

Ni^{2+} が HSP90 β の linker domain のどのアミノ酸残基に結合するのはいまだ不明であるが、これまでの報告から、アスパラギン酸残基などが Ni^{2+} との結合に関わっている可能性があると考えられる。肺炎レンサ球菌においては、 Ni^{2+} に選択的に結合するアミノ酸残基として、アスパラギン酸残基やバリン残基が関与する可能性が示唆されている [40]。HSP90 β の linker domain を構成する 62 個のアミノ酸のうち、10 個がアスパラギン酸残基であり、他の domain よりもアスパラギン酸残基の出現頻度が高い。ま

た、グルタミン酸残基も HSP90 β の linker domain を構成する 62 個のアミノ酸のうちの 18 個を占めており、細胞内では linker domain は多くの負電荷を帯びていると考えられる。そのため、linker domain のアスパラギン酸残基やグルタミン酸残基が Ni²⁺ との結合に関与する可能性がある。Zinc finger protein や superoxide dismutase、ヘリコバクターピロリが発現する urease、cyanocobalamin などはいずれも活性中心に Zn²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Co²⁺ が存在することが明らかとなっており、HSP90 β も何らかのメカニズムで Ni²⁺ に特異的に結合すると考えられるが、HSP90 β が Ni²⁺ と結合するメカニズムについては今後の検討課題である。今後、さらに研究を進めることで、Ni²⁺ と Co²⁺ の HSP90 β に対する結合の違いについて、三次元結晶構造解析などの手法で、原子レベルで解析を行う必要があると考えている。また、HSP90 β が Ni²⁺ に結合することによる構造変化が、HIF-1 α との結合にどのように影響するか、という点に関しても分子レベルで解析を行う必要がある。これまで、ATP binding domain を標的とした HSP90 阻害薬が開発されてきたが、これらは HSP90 の機能をほとんど全て阻害することができる。さらに研究を進めることで、HSP90 の linker domain の Ni²⁺ 結合部位を標的とする HSP90 阻害薬の開発につながり、より副作用の少ない、Ni²⁺ による炎症反応を選択的に阻害できる薬物の開発につながる可能性がある。

Ni²⁺ はヒト単球様細胞株 THP-1 細胞 [44] やヒト単球 [45]、ヒト単球由来樹状細胞 [46] などの様々な細胞において IL-8 発現を誘導することが明らかとなっている。本研究においても、ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 細胞及びヒト単球様細胞株 U937 細胞などの細胞で、Ni²⁺ は Co²⁺ よりも強力な IL-8 発現誘導作用を示した。HSP90 β は全身の細胞に恒常的に発現するため、Ni²⁺ は全身の細胞においても同様に HSP90 β と結合することで多様な生理作用を示す可能性があるが、Ni²⁺ が HIF-1 α のみの機能に影響を与えるのか、あるいは他のタンパク質の機能にも影響を与えるのかは、今後の課題である。

本研究は、Ni²⁺ と Co²⁺ の作用点の違いに着目し、Ni²⁺ が HSP90 β に結合すること

で HIF-1 α の核内移行及び転写活性化を誘導し、IL-8 発現を誘導する、という Ni²⁺ に特有の IL-8 発現誘導機構を初めて発見した (Fig. 18)。ステントは Ni 含有金属であり、ステントから溶出した Ni²⁺ は in vitro 及び in vivo で IL-8 発現を誘導することが明らかとなっている [12]。単球は血液を循環する白血球であり、ステントなどの Ni 含有金属に直接触れることで IL-8 を産生し、炎症やアレルギーを誘発すると考えられる。これらのことから、本研究が Ni²⁺ の新規標的タンパク質 HSP90 β を提言することで、ステントなどの Ni 含有金属から溶出した Ni²⁺ が引き起こす炎症反応メカニズムの解明につながり、HSP90 β を介するシグナル伝達を標的とした、Ni²⁺ 誘発性の炎症・アレルギーを制御する新規薬物や治療法の開発につながることが期待される。

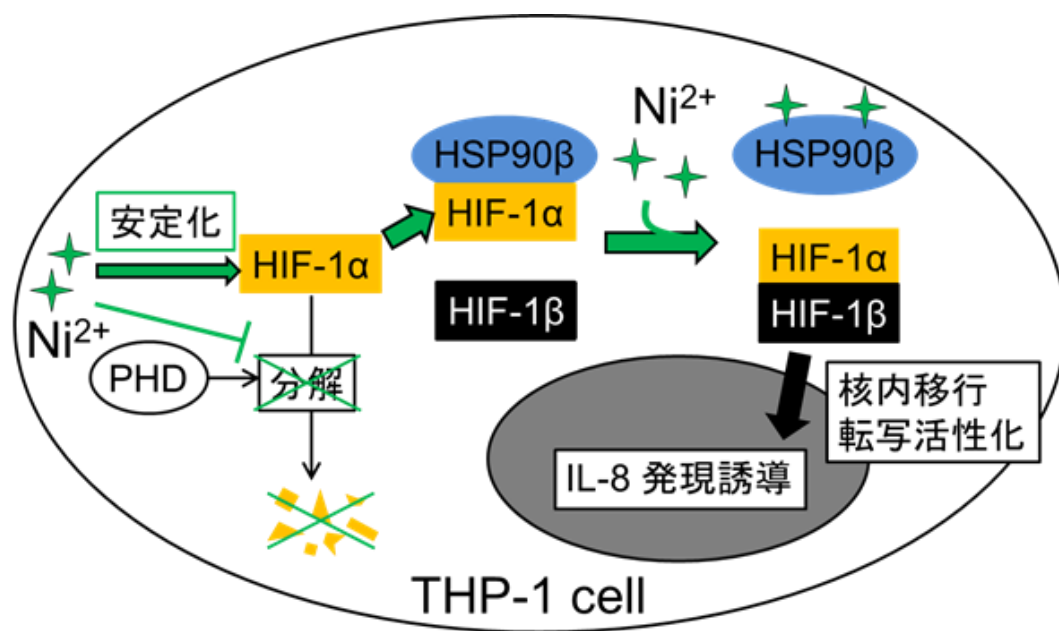


Figure 18. Mechanisms of Ni²⁺-induced IL-8 expression mediated by HSP90 β

6. 参考文献

1. Thyssen JP, Menné T (2010) Metal allergy--a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem Res Toxicol* 23: 309–318.
2. Pacheco KA (2015) Allergy to Surgical Implants. *J Allergy Clin Immunol Pract* 3: 683–695.
3. Svedman C, Möller H, Gruvberger B, Gustavsson CG, Dahlin J, et al. (2014) Implants and contact allergy: Are sensitizing metals released as haptens from coronary stents? *Contact Dermatitis* 71: 92-97.
4. Thyssen JP, Linneberg A, Menné T, Johansen JD (2007) The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* 57: 287–299.
5. Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K, Narushima T, et al. (2011) Enhancement of nickel elution by lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Dermatol Sci* 62: 50–57.
6. Kishimoto Y, Asakawa S, Sato T, Takano T, Nakajyo T, et al. (2017) Induced histamine regulates Ni elution from an implanted Ni wire in mice by downregulating neutrophil migration. *Exp Dermatol*: 1–7.
7. Sato T, Kishimoto Y, Asakawa S, Mizuno N, Hiratsuka M, et al. (2016) Involvement of COX-2 in nickel elution from a wire implanted subcutaneously in mice. *Toxicology* 363–364: 37–45.
8. Leonard EJ, Skeel A, Kutvirt S, Epps DVAN, Noer K (1990) Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant / activation protein-1. *J Immunol* 144: 1323-1330.
9. Dhingra N, Shemer A, Correa da Rosa J, Rozenblit M, Fuentes-Duculan J, et al. (2014) Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J Allergy Clin Immunol* 134: 362–372.
10. Hitzler M, Bergert A, Luch A, Peiser M (2013) Evaluation of selected biomarkers for the

- detection of chemical sensitization in human skin: A comparative study applying THP-1, MUTZ-3 and primary dendritic cells in culture. *Toxicol Vitro* 27: 1659–1669.
11. Larsen JM, Bonefeld CM, Poulsen SS, Geisler C, Skov L (2009) IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 123: 486–492.
 12. Arellano-Orden E, Serrano C, Montes-Worboys A, Sánchez-López V, Laborda A, et al. (2017) Stent-induced tracheal stenosis can be predicted by IL-8 expression in rabbits. *Eur J Clin Invest* 47: 84-92.
 13. Shimohata T, Nakano M, Lian X, Shigeyama T, Iba H, et al. (2011) *Vibrio parahaemolyticus* infection induces modulation of IL-8 secretion through dual pathway via VP1680 in Caco-2 cells. *J Infect Dis* 203: 537–544.
 14. Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC (2000) Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem* 275: 20861–20866.
 15. Lin C-H, Nai P-L, Bien M-Y, Yu C-C, Chen B-C (2014) Thrombin-induced CCAAT/enhancer-binding protein β activation and IL-8/CXCL8 expression via MEKK1, ERK, and p90 ribosomal S6 kinase 1 in lung epithelial cells. *J Immunol* 192: 338–348.
 16. Kyu Jung S, Hee Kim J, Joo Kim H, Hwa Ji Y, Hwan Kim J, et al. (2014) Silver Nanoparticle–Induced hMSC Proliferation Is Associated with HIF-1 α -Mediated Upregulation of IL-8 Expression. *J Invest Dermatol* 134: 3003–3007.
 17. Kim KS, Rajagopal V, Gonsalves C, Johnson C, Kalra VK (2006) A Novel Role of Hypoxia-Inducible Factor in Cobalt Chloride- and Hypoxia-Mediated Expression of IL-8 Chemokine in Human Endothelial Cells. *J Immunol* 177: 7211–7224.
 18. Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, et al. (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* 11: 814–

819.

19. Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, et al. (2004) Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* 279: 40337–40344.
20. Eltzschig HK, Carmeliet P (2011) Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 364: 1976–1977.
21. Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK, et al. (2004) Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 α stabilization. *Cell Physiol Biochem* 14: 351–360.
22. Wu D, Potluri N, Lu J, Kim Y, Rastinejad F (2015) Structural integration in hypoxia-inducible factors. *Nature* 524: 303–308.
23. Isaacs JS, Jung YJ, Neckers L (2004) Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator (ARNT) Promotes Oxygen-independent Stabilization of Hypoxia-inducible Factor-1 α by Modulating an Hsp90-dependent Regulatory Pathway. *J Biol Chem* 279: 16128–16135.
24. Wandinger SK, Richter K, Buchner J (2008) The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* 283: 18473–18477.
25. Ratzke C, Mickler M, Hellenkamp B, Buchner J, Hugel T (2010) Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. *Proc Natl Acad Sci* 107: 16101–16106.
26. Mayer MP, Prodromou C, Frydman J (2009) The Hsp90 mosaic: A picture emerges. *Nat Struct Mol Biol* 16: 2–6.
27. O'Neill S, Humphries D, Tse G, Marson LP, Dhaliwal K, et al. (2015) Heat shock protein 90 inhibition abrogates TLR4-mediated NF- κ B activity and reduces renal ischemia-reperfusion injury. *Sci Rep* 5: 1–11.
28. Ye B-X, Deng X, Shao L-D, Lu Y, Xiao R, et al. (2015) Vibsanin B Preferentially Targets

- HSP90 β , Inhibits Interstitial Leukocyte Migration, and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 194: 4489–4497.
29. Sun X, Yu G, Xu Q, Li N, Xiao C, et al. (2013) Putative cobalt- and nickel-binding proteins and motifs in *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics* 5: 928–935.
 30. Qiao Y, Ma L (2013) Quantification of metal ion induced DNA damage with single cell array based assay. *Analyst* 138: 5713–5718.
 31. Salnikow K, Su W, Blagosklonny M V., Costa M (2000) Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res* 60: 3375–3378.
 32. Andrea H (2001) Zinc Finger Proteins as Potential Targets for Toxic Metal Ions: Differential Effects on Structure and Function. *Antioxid Redox Signal* 3: 625–634.
 33. Toebak MJ, Pohlmann PR, Sampat-Sardjoepersad SC, Von Blomberg BME, Bruynzeel DP, et al. (2006) CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol Vitro* 20: 117–124.
 34. Freitas M, Fernandes E (2011) Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF- κ B and the release of cytokines from THP-1 monocytic cells. *Metallomics* 3: 1238–1243.
 35. García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, et al. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821–824.
 36. Dhingra N, Shemer A, Correa da Rosa J, Rozenblit M, Suárez-Fariñas M, et al. (2014) Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J Allergy Clin Immunol*: 14–17.
 37. Saito R, Hirakawa S, Ohara H, Yasuda M, Yamazaki T, et al. (2011) Nickel differentially regulates NFAT and NF- κ B activation in T cell signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 254: 245–255.
 38. Rachmawati D, Alsalem IWA, Bontkes HJ, Verstege MI, Gibbs S, et al. (2015) Innate

- stimulatory capacity of high molecular weight transition metals Au (gold) and Hg (mercury). *Toxicol Vitro* 29: 363–369.
39. Satoh T, Akira S (2016) Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. *Microbiol Spectr* 4: 1–7.
 40. Heiss K, Junkes C, Guerreiro N, Swamy M, Camacho-Carvajal MM, et al. (2005) Subproteomic analysis of metal-interacting proteins in human B cells. *Proteomics* 5: 3614–3622.
 41. Kuroishi T, Bando K, Tanaka Y, Shishido K, Kinbara M, et al. (2017) CXCL4 is a novel nickel-binding protein and augments nickel allergy. *Clin Exp Allergy*: 1069–1078.
 42. Thierse HJ, Moulon C, Allespach Y, Zimmermann B, Doetze A, et al. (2004) Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni²⁺ to TCR/MHC contact sites in nickel-specific human T cell activation. *J Immunol* 172: 1926–1934.
 43. Zhang W, Hirshberg M, McLaughlin SH, Lazar GA, Grossmann JG, et al. (2004) Biochemical and structural studies of the interaction of Cdc37 with Hsp90. *J Mol Biol* 340: 891–907.
 44. Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H (2007) Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol Vitro* 21: 428–437.
 45. Götz L, Buerfent BC, Hofmann A, Rühl H, Fricker N, et al. (2016) Genome-wide transcriptome induced by nickel in human monocytes. *Acta Biomater* 43: 1–14.
 46. Bechara R, Antonios D, Azouri H, Pallardy M (2017) Nickel sulfate promotes IL-17A producing CD4⁺ T-cells by an IL-23 dependent mechanism regulated by TLR4 and Jak-STAT pathways. *J Invest Dermatol* 137: 2140-2148.

謝辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院 薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 教授 平澤 典保 先生に謹んで深く御礼申し上げます。

本研究に関して、終始多大なる御指導・御助言を賜りました東北大学大学院 薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 准教授 平塚 真弘 先生、准教授 守屋 孝洋 先生、助教 水野 夏実 先生、助手 瀬川 良佑 先生に心より御礼申し上げます。

本論文の執筆にあたり、主査ならびに副査を引き受けてくださり、研究内容を細部に至るまでご理解頂き、貴重な御助言を賜りました東北大学 薬学研究科 生命機能解析学分野 教授 倉田 祥一郎 先生 ならびに 東北大学 薬学研究科 生体防御薬学分野 准教授 黄 基旭 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、快く共焦点顕微鏡を使用させて下さいました東北大学大学院 薬学研究科 分子細胞生化学分野 教授 青木 淳賢 先生 ならびに快く LC/MS/MS の使用法をご教授下さいました東北大学大学院 薬学研究科 がん化学療法薬学分野 助手 金光 祥臣 先生に深く感謝申し上げます。

本研究は公益社団法人 日本薬学会による日本薬学会長井記念薬学研究奨励金の支援により行われたものです。公益社団法人 日本薬学会には、学会活動や奨励金など、様々な面で多大なる御支援を賜りました。心より感謝申し上げます。

7 年半に渡る研究室生活において、常に心の支えになってくださり、お力添えをいただきました生活習慣病治療薬学分野の皆様、心より感謝いたします。本論文を執筆するまで研究活動を続けることができたのは、皆様のおかげです。

最後に、10 年もの長い間、学生生活を支えて下さいました家族に、感謝申し上げます。

発表論文リスト

1.

Nickel ions selectively inhibit lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production by decreasing its mRNA stability.

Asakawa S, Kishimoto Y, Takano T, Okita K, Takakuwa S, Sato T, Hiratsuka M, Takeuchi O, Hirasawa N.

2015; PLoS One 10: e0119428

2.

Nickel ions bind to HSP90 β and enhance HIF-1 α -mediated IL-8 expression.

Asakawa S, Onodera R, Kasai K, Kishimoto Y, Sato T, Segawa R, Mizuno N, Ogasawara K, Moriya T, Hiratsuka M, Hirasawa N.

2018; Toxicology. 395: 45-53